

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie

Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

a

Koordinační místo pro vědeckou a technickou spolupráci s EFSA v ČR,

Ministerstvo zemědělství

a

Časopis MASO – odborný časopis pro obor zpracování masa

XXVII. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

konané v roce 35. výročí založení Fakulty veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzity Brno

Sborník příspěvků

VETUNI Brno, 5. 6. 2025



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



Elektronický sborník byl vydán 5. 6. 2025

Editace: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.
 doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
 Mgr. Ing. Bohdana Mrňousová, Ph.D.
 Mgr. Alena Zouharová, Ph.D.

ISBN 978-80-7305-995-8

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.



OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Charakteristika kombuchy na báze dubových listov	
Pencák, T., Dordević, D., Cavar Zeljkovic, S., Tremlová, B.....	5
Využitie kávovej usadeniny ako udržateľného zdroja pre vývoj biodegradovateľných viečok	
Kotianová, D., Kösslerová, K., Dordević, D., Tremlová, B.	8
Vplyv proteínového koncentrátu z fava fazule na kvalitatívne, nutričné a senzorické vlastnosti cestovín	
Holkovičová, T., Kohajdová, Z., Lauková, M., Minarovičová, L., Píri, V.	11
Vplyv prídavku jablkovej vlákniny na kvalitatívne parametre a senzorické vlastnosti bezlepkových sušienok	
Píri, V., Holkovičová, T., Minarovičová, L., Lauková, M., Kohajdová, Z.	15
Vliv pořadí laktace a sezónnosti na obsah laktoferinu v kravském mléce	
Pospíšil, J., Bartáková, K., Vorlová, L., Hanuš, O., Navrátilová, P.....	19
Modelování vlivu skladovacích podmínek na růstové parametry <i>Bacillus cereus</i> ve vařených pšeničných těstovinách	
Stojanová, K., Bursová, Š., Necidová, L., Bartáková, K., Haruštiaková, D., Pechanová, K., Mátl, P.	22
Genetické vlastnosti izolátů MRSA CC398 u zvířat: Porovnání mezi hospodářskými zvířaty, domácími mazlíčky a lidmi	
Brodíková, K., Karpíšková, R.	25
Vliv ochranné kultury na mikrobiologickou kvalitu dušené šunky	
Ondruchová, S., Dušková, M., Veselá, H., Navrátilová, P., Zouharová, A., Hušáková, M., Ježek, F., Kameník, J.	28
Dynamic changes in the plasmidome and resistome in the gastrointestinal tract of chickens	
Rysava, M., Palkovicova, J., Schwarzerova, J., Cejkova, D., Stredanska, K., Jakubickova, M., Aytan-Aktug, D., Otani, S., Dolejska, M.	31

SEKCE 2: CHOV ZVÍŘAT, VÝŽIVA ZVÍŘAT A BIOCHEMIE

Vliv rizikových faktorů na výskyt equinního astmatu	
Vondráčková, T., Jahn, P., Jánová, E.	35

Vliv diet obohacených o alternativní komponenty na vybrané ukazatele jatečné hodnoty u brojlerových králíků	
Poláková, K., Šimek, V., Dobšíková, R.	38

SEKCE 3: OCHRANA ZVÍŘAT, WELFARE A ETOLOGIE

Výskyt a rozložení bisfenolu A v konzervovaném krmivu pro psy	
Konečná, N., Kovaříková, S., Maršálek, P., Malá, V., Štěpánková, K.	42
Aktivita a projevy chování brojlerových kuřat v domácím chovu a velkochovu	
Kálnoky, M. M., Voslářová, E.	45
Effect of housing type on guinea pig behaviour	
Vacušková, Z., Vacuška, D., Večerek, V.	48
Calming signals and changes in surface temperature in therapy dogs	
Vacuška, D., Vacušková, Z., Voslářová, E., Večerek, V.	51
Effect of lamotrigine on early developmental stages of zebrafish (<i>Danio rerio</i>) – behavioural study	
Hesova, R., Riesova, B., Svobodova, Z., Linhart, P., Heloysa Araujo-Silva, Christian Tudorache, Lakdawala, P.	54
Působení vzdálenosti přepravy a ročního období jako synergických faktorů na počty úhynů brojlerů kura domácího a kachen domácích při jejich přepravě na jatky	
Justová, E., Večerek, V., Voslářová, E., Semerád, Z.	57

SEKCE 4: VEŘEJNÉ A SOUDNÍ VETERINÁŘSTVÍ A TOXIKOLOGIE

Vliv 17α-ethinylestradiolu na životní funkce dania pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)	
Pešková, N., Blahová, J., Hollerová, A., Weiserova, Z., Hodkovicová, N., Maršálek, P., Tichý, F., Franc, A., Svobodová, Z.	62
Vplyv spomaľovačov horenia na báze organických zlúčenín fosforu na embryonálny vývoj dania pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)	
Vargová, M. F., Lehocká, K., Cahová, J., Plhalová, L., Novotná Kružíková, K., Pešková, N., Mikula, P.	65
Effect of fluconazole and its metabolite 1,2,4 - triazole on the early developmental stages of the African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	
Riesová, B., Hesova, R., Blahova, J., Koriakina, E., Vargova, M., Agostini, M. L., Harnos, J., Lakdawala, P.	68

SEKCE 5: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE A CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT
Morfometrická analýza luptoušů (Phthiraptera: Amblycera) rodu *Trochiliphagus* a *Trochiloecetes* u kolibříků

Schmiedová, A. M., Sychra, O., Čapek, M., Literák, I. 72

Prevalence filariální infekce v krvi a ektoparazitech netopýrů

Vévodová, V., Němcová, M., Bednaříková, Š., Pikula, J. 75

Comparison of morphological and molecular identification of *Apodemus* species and AP-PCR optimization

Kozlíková, E., Bártová, E., Čadková, Z. 78

Collision risk of red kites (*Milvus milvus*) with wind turbines revealed by GPS telemetry

Škrábal, J., Raab, R., Gruebler, M., Literák, I., Raab, R. 81

Evolučné adaptácie a rezistencia u *Escherichia coli* ST744

Krúteková, K., Nešporová, K., Palkovičová, J., Dolejská, M., Govers, S. K. 85

Diverzita, hostitelské vazby a geografické rozšíření všenek rodu *Myrsidea* (Amblycera: Menoponidae)

Schneider, M., Kolencik, S., Johnson, K. P., Weckstein, J. D., Sallam, M. F., Allen, J., Sychra, O. 88

Rozdíly v životních strategiích: luptouši versus péřovky

Kolenčík, S., Loaiza-Muñoz, M.A., Londono, G.A., Allen, J.M., Plšková, K., Sychra, O. 91

Baktérie odolné voči antibiotikám u voľne žijúcich vtákov naprieč Palearktídou

Zelinová, L., Davidová Geržová, L., Sukkar, I., Tarabai, H., Růžicková, M., Nohejl, T., Raab, R., Dostál, M., Matušik, H., Karyakin, I., Skyrpan, M., Literák, I., Dolejská, M. 85

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Charakteristika kombuchy na báze dubových listov

Characteristics of oak leaf-based kombucha

¹Pencák Tomáš, ¹Dordevic Dani, ^{2,3}Cavar Zeljkovic Sanja, ¹Tremlová Bohuslava

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

²Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Olomouc

³Český institut výzkumu a pokročilých technologií, Univerzita Palackého v Olomouci

Summary

*The aim of this study was to evaluate the chemical properties of kombucha made from oak leaves (*Quercus petraea*), which could serve as an alternative plant material for its production. In most samples, fermentation led to an increase in the total polyphenol content as well as individual phenolic compounds compared to the infusions before fermentation. The decrease in pH values and levels of sucrose, fructose, and glucose indicated strong activity of yeast and acetic acid bacteria, which may indicate a healthy fermentation process. The low levels of residual sugars suggest that shorter fermentation times could be suitable in relation to the final sweetness, which may influence sensory acceptability.*

Keywords: *Quercus spp.; fermentation; polyphenols; beverage*

Úvod

Tradičná kombucha predstavuje fermentovaný nápoj z čierneho čaju, ktorý využíva spontánnu fermentáciu baktérií octového kvasenia, baktérií mliečného kvasenia a kvasiniek (Villarreal-Soto et al., 2018). Tento nápoj sa stal v poslednej dobe vysoko populárnym v západných kultúrach ako funkčný nápoj vďaka svojim údajným zdravotným benefitom (Laureys et al., 2020). Niektoré štúdie poukazujú na možnosť využitia alternatívnych rastlinných zdrojov na prípravu tohto nápoja, s čím súvisí aj iné zloženie látok s antioxidačným účinkom (Marsh et al., 2014). Extrakty dubových listov preukázali prítomnosť mnohých polyfenolických látok s antioxidačným účinkom, ktoré môžu ponúknuť niektoré zdravotné benefity (García-Villalba et al., 2017; Araiza-Alvarado et al., 2025). Cieľom tejto práce bola výroba kombuchy z dubových listov (*Quercus petraea*) so zameraním na jej chemické vlastnosti, pomocou viacerých technologických úprav listov a rôznych dĺžok fermentácie.

Materiál a metódy

Na prípravu výluhov a kombuchy boli použité čerstvé, sušené (24 h, 40 °C) a sušené-drvené (24 h, 40 °C s veľkosťou častíc 1 mm – 1 cm) dubové listy (*Quercus petraea*) ako aj čierny čaj k príprave kontrolnej vzorky. K 10 g vzorky bol pridaný 1 l vriacej vody s časom lúhovania 10 minút a následne bolo pridaných 100 g cukru. Po ochladení na izbovú teplotu bola k nálevom pridaná symbiotická kultúra (SCOBY) spoločne so 150 ml štartéra kombuchy. Fermentácia prebiehala za aeróbnych podmienok pri izbovej teplote (25°C) počas 7, 10 a 13 dní.

K stanoveniu celkového obsahu polyfenolov bolo pridaných 0,1 ml vzorky spolu s 20 ml zmesi etanol:voda (1:1). Vzorky boli následne extrahované na ultrazvuku po dobu 30 minút a prefiltrovali. 1 ml filtrovaného extraktu bol zmiešaný s 5 ml 10 % roztoku Folin–Ciocalteu a 4 ml 7,5 % roztoku Na₂CO₃. Zmes sa následne inkubovala 30 minút v 25 ml odmernej banke v tmavom prostredí. Po inkubácii sa do banky pridala destilovaná voda po rysku. Vzorky boli analyzované pri vlnovej dĺžke 765 nm.

Hodnota pH bola stanovená pomocou stolového pH metra Orion 4 STAR (Thermo Scientific, USA).

Na analýzu glukózy, fruktózy a sacharózy pomocou UHPLC-MS/MS boli jednotlivé sacharidy separované na kolóne Rezex RCM Monosaccharide Ca⁺ (300 mm x 7,8 mm, 8 µm). Detekcia bola vykonaná pomocou ELSD detektora s prietokom dusíka 2 l.min⁻¹ s teplotou detektora 80 °C.

Výsledky a diskusia

Hodnoty z tabuľky 1 preukázali pozitívny vplyv fermentácie na nárast celkového obsahu polyfenolov so štatisticky významným rozdielom ($p < 0,05$) u vzoriek sušeného a sušeného-dreveného listu už po 7 dňoch fermentácie. Vplyv na obsah polyfenolických látok preukázala aj technologická úprava listov pred fermentáciou, kde najnižšie hodnoty boli zaznamenané u vzorky čerstvých listov a najvyššie hodnoty boli naopak namerané u sušených-drevených listov. Nárast polyfenolov u tejto vzorky mohol byť spojený s koncentráciou týchto látok v procese sušenia ako aj zvýšením dostupnosti týchto látok v procese drvenia.

Meranie pH hodnôt počas fermentácie je rozhodujúcim faktorom, ktorý určuje správnosť fermentácie a používa sa na určenie ukončenia fermentačných procesov (Neffe-Skocińska et al., 2017). Odporúčaný rozsah pH u kombuchy z hľadiska bezpečnosti predstavuje hodnoty od 2.5 do 4.2 (de Miranda et al., 2022). Z nameraných hodnôt v tabuľke 1 je zrejmý pokles pH v kombuche na bezpečné hodnoty v porovnaní s pH výluhov pred fermentáciou u všetkých dĺžok fermentácie.

Tabuľka 1: Celkový obsah polyfenolov a hodnoty pH výluhov a kombuche.

Celkový obsah polyfenolov (mg GAE/g)				
vzorka	výluh	7. deň	10. deň	13. deň
Čerstvý list	0,05 ± 0,06 ^{aBC}	0,08 ± 0,01 ^{aB}	0,11 ± 0,01 ^{aC}	0,10 ± 0,01 ^{aC}
Sušený list	0,07 ± 0,03 ^{aB}	0,12 ± 0,00 ^{bC}	0,14 ± 0,00 ^{bD}	0,16 ± 0,02 ^{bD}
Sušený a drvený list	0,07 ± 0,00 ^{aB}	0,15 ± 0,00 ^{cC}	0,21 ± 0,05 ^{bCD}	0,21 ± 0,01 ^{cD}
Čierny čaj	0,27 ± 0,01 ^{bB}	0,25 ± 0,03 ^{dBC}	0,20 ± 0,08 ^{abBC}	0,23 ± 0,01 ^{cC}
pH				
vzorka	výluh	7. deň	10. deň	13. deň
Čerstvý list	7,00 ± 0,05 ^{aA}	3,04 ± 0,02 ^{aB}	3,15 ± 0,04 ^{aC}	3,13 ± 0,01 ^{aC}
Sušený list	6,68 ± 0,03 ^{bA}	3,27 ± 0,06 ^{bB}	3,24 ± 0,01 ^{bB}	3,19 ± 0,01 ^{bB}
Sušený a drvený list	6,63 ± 0,04 ^{bA}	3,33 ± 0,01 ^{bcB}	3,31 ± 0,02 ^{cB}	3,28 ± 0,02 ^{cB}
Čierny čaj	6,61 ± 0,02 ^{bA}	3,37 ± 0,03 ^{cB}	3,31 ± 0,02 ^{cC}	3,22 ± 0,01 ^{bD}

malé písmená v hornom indexe označujú štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) medzi vzorkami pre každý stĺpec.

veľké písmená v hornom indexe označujú štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) medzi vzorkami pre každý riadok.

V tabuľke 2 sú zobrazené hodnoty sacharózy, fruktózy a glukózy vo výluhoch pred fermentáciou ako aj v kombuche.

Tabuľka 2: Obsah cukrov vo výluhoch a kombuche.

Sacharóza g·l ⁻¹				
vzorka	výluh	7. deň	10. deň	13. deň
Čerstvý list	2,16 ± 0,11 ^{abA}	6,44 ± 0,16 ^{aB}	0,20 ± 0,01 ^{aC}	0,20 ± 0,01 ^{aD}
Sušený list	2,38 ± 0,16 ^{aA}	7,61 ± 0,41 ^{bB}	8,03 ± 0,11 ^{bB}	0,97 ± 0,04 ^{bc}
Sušený a drvený list	2,81 ± 0,05 ^{cA}	6,28 ± 0,22 ^{aB}	0,12 ± 0,01 ^{aC}	0,98 ± 0,06 ^{bD}
Čierny čaj	2,08 ± 0,07 ^{bA}	3,92 ± 0,36 ^{cB}	5,88 ± 0,40 ^{cC}	0,16 ± 0,01 ^{aD}
Fruktóza g·l ⁻¹				
vzorka	výluh	7. deň	10. deň	13. deň
Čerstvý list	2,61 ± 0,21 ^{aB}	8,11 ± 0,16 ^{aC}	0,21 ± 0,04 ^{aD}	0,26 ± 0,04 ^{aD}
Sušený list	2,90 ± 0,05 ^{aB}	9,19 ± 0,12 ^{bc}	8,85 ± 0,38 ^{bc}	1,13 ± 0,12 ^{bD}
Sušený a drvený list	3,43 ± 0,15 ^{bB}	3,57 ± 0,44 ^{cB}	0,15 ± 0,02 ^{aC}	0,66 ± 0,05 ^{cBC}
Čierny čaj	2,77 ± 0,21 ^{aB}	5,38 ± 0,26 ^{dC}	6,93 ± 0,08 ^{dD}	0,22 ± 0,02 ^{aE}
Glukóza g·l ⁻¹				
vzorka	výluh	7. deň	10. deň	13. deň
Čerstvý list	nd	0,02 ± 0,00 ^{aB}	0,03 ± 0,00 ^{aC}	0,03 ± 0,00 ^{aBC}
Sušený list	nd	0,03 ± 0,00 ^{bB}	0,06 ± 0,00 ^{bc}	0,09 ± 0,00 ^{bD}
Sušený a drvený list	nd	2,41 ± 0,10 ^{acB}	0,04 ± 0,01 ^{aC}	0,06 ± 0,00 ^{cC}
Čierny čaj	0,01 ± 0,00 ^B	0,04 ± 0,00 ^{cC}	0,06 ± 0,00 ^{bD}	0,06 ± 0,00 ^{cD}

malé písmená v hornom indexe označujú štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) medzi vzorkami pre každý stĺpec.

veľké písmená v hornom indexe označujú štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) medzi vzorkami pre každý riadok.

Vo výluhoch dubových listov pred prídavkom sacharózy bol zaznamenaný prirodzený výskyt sacharózy ($2,16 - 2,81 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a fruktózy ($2,61 - 3,43 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). Prítomnosť glukózy vo výluhoch nebola detekovaná. U vzoriek kombuchy boli najvyššie hodnoty sacharózy a fruktózy namerané v 7. deň fermentácie s následným poklesom pri dlhších fermentačných časoch. Nízke hodnoty zostatkových cukrov v nápoji po fermentácii preukazujú silnú fermentačnú schopnosť a zároveň by mohli ovplyvniť nedostatočnú sladivosť v tomto nápoji. Z toho dôvodu by mohlo byť vhodné skrátiť fermentačný čas alebo zvýšiť obsah pridanej sacharózy k zabezpečeniu dostatočnej sladivosti finálneho produktu.

Záver

Dubové listy predstavujú potenciálny alternatívny rastlinný materiál na produkciu kombuchy. Výsledky tejto štúdie poukazujú na pozitívny vplyv fermentácie výluhov dubových listov na nárast polyfenolov, ktoré môžu predstavovať látky s antioxidačným účinkom. Zaznamenané hodnoty pH ako aj hodnoty zostatkových cukrov preukázali správny priebeh fermentácie už po 7 dňoch fermentácie. V rámci optimalizácie receptúry v súvislosti s prijateľnosťou tohto nápoja v budúcom výskume, by bolo vhodné otestovať kratšie fermentačné časy, ktoré by mohli pozitívne ovplyvniť finálnu kyslosť a sladivosť kombuchy.

Literatúra

ARAIZA-ALVARADO, A.; ÁLVAREZ, S. A.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; SÁNCHEZ-BURGOS, J. A.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GONZÁLEZ-HERRERA, S. M.; MORENO-JIMÉNEZ, M. R.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; CERVANTES-CARDOZA, V. Sweetening with Agavins: Its Impact on Sensory Acceptability, Physicochemical Properties, Phenolic Composition and Nutraceutical Potential of Oak Iced Tea. *Foods*. 2025, vol. 14, no. 5, 833.

DE MIRANDA, J. F.; RUIZ, L. F.; SILVA, C. B.; UEKANE, T. M.; SILVA, K. A.; GONZALEZ, A. G. M.; FERNANDES, F. F.; LIMA, A. R.. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Food Science*. 2022, vol. 87, no. 2, s. 503-527.

GARCÍA-VILLALBA, R.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ROCHA-GUZMÁN, N. E. Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven Quercus leaf teas. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017, vol. 63, no. 2017, s. 38-46.

LAUREYS, D., BRITTON, S. J., DE CLIPPELEER, J. Kombucha Tea Fermentation: a Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2020, vol. 78, no. 3, s. 165-174.

MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*. 2014, vol. 38, no. 2, s. 113-124.

NEFFE-SKOCIŇSKA, K.; SIONEKA, B.; ŚCIBISZB, I.; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, D. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha teabeverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA – Journal of food*. 2017, vol. 15, no. 4, 601-607.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J-P.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*. 2017, vol. 83, no. 3, s. 580-588.

Kontaktná adresa: Tomáš Pencák, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného pôvodu, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23448@vfu.cz

Využitie kávovej usadeniny ako udržateľného zdroja pre vývoj biodegradovateľných viečok

Utilization of spent coffee grounds as a sustainable source for the development of biodegradable lids

¹Kotianová Dominika, ¹Kösslerová Karolína, ¹Dordević Dani, ¹Tremlová Bohuslava

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Summary

This research aimed to develop biodegradable lids based on carrageenan with various concentrations of spent coffee grounds (SCG) extracts, as potential additives to impact the functionality of the lids. To assess the properties of prepared samples, the total polyphenol content (TPC), moisture levels and solubility were evaluated. The results showed a significant increase in TPC in all SCG-enriched samples, confirming SCG extract as a valuable antioxidant source. The highest TPC was found in the sample containing 75% SCG extract (7.12 ± 0.03 mg GAE/g). Incorporating SCG extracts into the lids also led to a significant reduction in moisture content compared to the control sample, except for the sample with 100% SCG extract. Solubility test revealed complete dissolution in distilled and seawater after 24h, for all samples. These findings highlight the potential of SCG as a functional ingredient. However, further optimization is needed to balance antioxidant activity and textural properties.

Keywords: food waste valorization; sustainable packaging; antioxidant properties; circular economy

Úvod

Plasty na báze syntetických polymérov sa v súčasnej dobe radia medzi najčastejšie využívané materiály naprieč rôznymi odvetvami priemyslu. Ich rozsiahle využitie je podmienené predovšetkým ich výbornými fyzikálne-chemickými vlastnosťami, flexibilitou a dostupnosťou. Avšak rastúci dopyt po týchto obalových materiáloch vedie k neustále rastúcej produkcii plastového odpadu, ktorý je vďaka svojej odolnosti voči rozkladu závažným environmentálnym problémom (Evide et al., 2021). Z tohto dôvodu sa v posledných rokoch výskum zameriava na vývoj biodegradovateľných plastov, ktoré by boli schopné, či už čiastočne, alebo plnohodnotne nahradiť konvenčné obaly. Na základe výskumov bolo zistené, že ich funkčné vlastnosti je možné vylepšiť prídavkom extraktov z rastlín alebo vedľajších produktov potravinárskej výroby bohatých na bioaktívne zlúčeniny (Khan a Iqbal, 2023). Kávová usadenina (SCG – Spent Coffee Ground), ktorá vzniká ako vedľajší produkt pri príprave kávy, predstavuje významný zdroj bioaktívnych zlúčenín, a to predovšetkým polyfenolov, ktoré majú schopnosť ovplyvňovať morfológické, fyzikálne a mechanické vlastnosti biopolymérov (Dirpan et al., 2023). Práve vďaka týmto vlastnostiam a ľahkej dostupnosti sa SCG javí ako perspektívna surovina pre vývoj funkčných biologicky rozložiteľných materiálov. Cieľom tejto štúdie bolo zhodnotiť vplyv prídavku rôznych koncentrácií extraktu z kávovej usadeniny na antioxidačné vlastnosti, vlhkosť a rozpustnosť experimentálne pripravených biodegradovateľných viečok.

Materiál a metódy

Na účely experimentu bola použitá SCG (100% Arabika), pochádzajúca z lokálnej kaviarne v Brne. Vzorka 1,2 g SCG bola navážená do 250 ml kádinky, do ktorej bola následne pridaná destilovaná voda za účelom prípravy 100% extraktu. Zmes bola zahrievaná na magnetickej miešačke s ohrevom (Benchmark Hotplate Stirrer) pri 400 ot./min. až do bodu varu, ktorý bol udržiavaný po dobu 4 minút. Po vychladnutí bol extrakt prefiltrovaný. V rámci experimentu boli pripravené nasledovné koncentrácie extraktu zo SCG: 25 %, 50 %, 75 % a 100 %.

Na prípravu biodegradovateľných viečok bolo navážených 0,9 g κ -karagenanu. A ako rozpúšťadlo bolo použitých buď 135 ml destilovanej vody, v prípade kontrolnej vzorky, alebo extraktu zo SCG vo vyššie uvedených koncentráciách. V ďalšom kroku bolo do každej vzorky pridaných 0,75 ml glycerolu a zmes bola zahriata na teplotu 50 °C, 10 min. Takto pripravená zmes bola následne naliata do Petriho misiek a ponechaná k vysušeniu po dobu 48 hodín.

Na stanovenie celkového obsahu polyfenolov (TPC – Total Polyphenols Content) bolo do tmavej vialky navážených 0,1 g vzorky viečok, do ktorej bolo následne pridaných 20 ml rozpúšťadla – absolútny etanol s vodou v pomere 1:1. Takto pripravená zmes bola vložená do ultrazvukovej vodnej kúpele na 30 min. Po prefiltrovaní cez striekačkový filter bol 1 ml extraktu prenesený do 25 ml odmernej banky, do ktorej bolo pridaných 5 ml zriedeného (1:10) roztoku Folin Ciocalteu a 4 ml 7,5% roztoku Na_2CO_3 . Vzorky boli inkubované v tme, po dobu 30 min., a následne spektrofotometricky stanovené pri vlnovej dĺžke 765 nm voči slepej vzorke. Výsledky boli vyjadrené ako mg kyseliny gallovej na gram vzorky.

Obsah vody v pripravených vzorkách bol stanovený po rozrezaní viečok na štvorce s rozmermi 2×2 cm, ktoré boli najskôr odvážené (W_1) a následne sušené (Ecocell 55, BMT Medical Technology s.r.o., Brno, Česká republika) pri teplote 105 °C, 24 hodín. Po vysušení boli vzorky opätovne odvážené (W_2). Zo získaných údajov bol vypočítaný obsah vody v jednotlivých vzorkách. Rozpustnosť bola stanovená v destilovanej a morskej vode po 24 hodinách od namočenia vzoriek. Výsledky boli štatisticky spracované testom ANOVA za použitia programu IBM SPSS.

Výsledky a diskusia

Výsledky meraní celkového obsahu polyfenolov, obsahu vody a rozpustnosti sú uvedené v tabuľke č. 1. Na základe výsledkov analýzy TPC možno konštatovať, že prídavok extraktov zo SCG viedol k štatisticky významnému ($p < 0,05$) zvýšeniu celkového obsahu polyfenolov vo všetkých obohatených vzorkách experimentálne pripravených viečok, pričom najvyššia hodnota bola zaznamenaná pri koncentrácii SCG 75 %. Tieto výsledky sú v súlade aj s inými štúdiami, v ktorých sa popisuje obsah polyfenolických látok zo SCG v koncentráciách približne od 1,30 mg/g až do 33,79 mg/g v závislosti od spôsobu extrakcie (Dordevic et al., 2024; Brzezińska et al., 2023). Tieto zistenia zároveň poukazujú na potenciál využitia SCG ako funkčnej zložky pre výrobu biopolymérov. Minimálne množstvo polyfenolických látok bolo zistené aj v kontrolnej vzorke, čo je pripisované prítomnosti a počtu sulfátových skupín v štruktúre karagenanu (Benbettaieb et al., 2019).

Tabuľka č. 1: Výsledky analýz experimentálne pripravených viečok.

Vzorka	TPC (mg kyseliny gallovej/g)	Obsah vody (%)	Rozpustnosť morská voda (%)	Rozpustnosť destilovaná voda (%)
Kontrola	$0,11 \pm 0,02^a$	$53,02 \pm 0,12^a$	100	100
SCG 25 %	$2,44 \pm 0,22^b$	$49,24 \pm 0,21^b$	100	100
SCG 50 %	$4,12 \pm 0,02^c$	$50,05 \pm 0,35^b$	100	100
SCG 75 %	$7,12 \pm 0,03^d$	$48,21 \pm 0,69^b$	100	100
SCG 100 %	$6,87 \pm 0,11^e$	$52,26 \pm 0,23^a$	100	100

Malé písmená v hornom indexe značia štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) v rámci stĺpca.

V prípade obohatených viečok bol zaznamenaný pokles obsahu vody u väčšiny vzoriek, v porovnaní s kontrolou, s výnimkou vzorky SCG 100 %. Najnižší obsah vody bol spozorovaný pri koncentrácii 75 % SCG. Pri 100 % koncentrácii sa však vlhkosť opäť zvýšila a priblížila sa hodnote kontroly, tento jav môže súvisieť s interakciami medzi fenolickými zlúčeninami

a hydroxylovými skupinami v karagenane, ktoré ovplyvňujú schopnosť viazať vodu (Liu et al., 2019). V porovnaní so štúdiou Dordevic et al. (2024) boli hodnoty obsahu vody v našich vzorkách vyššie, čo môže na jednu stranu pozitívne ovplyvniť textúru materiálu, ale zároveň môže znížiť aj jeho ochranné vlastnosti (Apriliyani et al., 2020). Čo sa týka rozpustnosti viečok v destilovanej a morskej vode, bolo zistené, že prídavok extraktov zo SCG nemal na tento parameter žiadny vplyv. Rozpustnosť bola, po 24 hodinách od namočenia, 100% u všetkých typov vzoriek.

Záver

Získané výsledky potvrdzujú, že extrakt z kávovej usadeniny predstavuje významný zdroj bioaktívnych zlúčenín, ktoré pozitívne ovplyvňujú vlastnosti biodegradovateľných viečok. Najvýraznejší efekt bol pozorovaný pri 75 % koncentrácii extraktu zo SCG, ktorá viedla k najvyššiemu obsahu polyfenolov a zároveň k najvýraznejšiemu zníženiu vlhkosti v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Úplná rozpustnosť všetkých vzoriek poukazuje na ich potenciál ako ekologicky priaznivých alternatív k tradičným plastovým materiálom. Ďalší výskum by mal byť zameraný na optimalizáciu mechanických vlastností experimentálne pripraveného materiálu.

Literatúra

APRILIYANI, M.W.; PURDAWI; MANAB, A.; APRILIYANI, M.W.; IKHWAN, A.D. Characteristics of Moisture Content, Swelling, Opacity and Transparency with Addition Chitosan as Edible Films/Coating Base on Casein. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 2020, vol. 18, no. 1, 9-14.

BEHBAHANI, B.; A.; SHAHIDI, F.; YAZDI, F. T.; MORTAZAVI, S. A.; MOHEBBI, M. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International journal of biological macromolecules*. 2017, vol. 94, 515-526.

BRZEZIŃSKA, R.; GÓRSKA, A.; WIRKOWSKA-VOJDYLA, M.; OSTROWSKA-LIGEZA, E. Spent Coffee Grounds – A Coffee By-Product Abundant in Bioactive Compounds wit Antioxidant Properties. *Biology and Life Science Forum*. 2023, vol. 23, no. 1. 1-7.

DIRPAN, A.; AINANI A. F.; DJALAL M. A Review on Biopolymer-Based Biodegradable Film for Food Packaging: Trends over the Last Decade and Future Research. *Polymers*. 2023, vol. 15, no. 13, 1-33.

DORDEVIC, D.; GABLO, N.; ZELENKOVA, L.; DORDEVIC, S.; TREMLOVA, B. Utilization of Spent Coffee Grounds as a Food By-Product to Produce Edible Films Based on κ -Carrageenan with Biodegradable and Active Properties. *Foods*. 2024, vol. 13, no. 12, 1-15.

EVODE, N.; QAMAR, S.A.; BILAL, M.; BARCELÓ, D.; IQBAL, H.M.N. Plastic waste and its management strategies forenvironmental sustainability. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. 2021, vol. 4, no. 4, 1-8.

KHAN, S.; IQBAL, A. Organic polymers revolution: Applications and formation strategies, and future perspectives. *Journal of Polymer Science and Engineering*. 2023, vol. 6, no.1, 1-25.

LIU, Y.; QIN, Y.; BAI, R.; ZHANG, X.; YUAN, L.; LIU, J. Preparation of pH-sensitive and antioxidant packaging films based on κ -carrageenan and mulberry polyphenolic extract. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, vol. 134, 993-1001.

Kontaktní adresa: Dominika Kotianová, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23446@vfu.cz

Vplyv proteínového koncentrátu z fava fazule na kvalitatívne, nutričné a senzorické vlastnosti cestovín

Impact of fava bean protein concentrate on the qualitative, nutritional, and sensory properties of pasta

¹Tatiana Holkovičová, ¹Zlatica Kohajdová, ¹Michaela Lauková, ¹Lucia Minarovičová, ¹Viktória Píri

¹Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav potravinárstva a výživy, Oddelenie potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR

Summary

The growing demand for nutritionally valuable and sustainable food products is driving the development of innovative cereal-based formulations enriched with plant proteins. The aim of this study was to evaluate the impact of incorporating fava bean protein concentrate (0-40%) on the qualitative, nutritional, and sensory characteristics of pasta. The results demonstrated that the enriched pasta samples had significantly higher protein content compared to the control. Additionally, the incorporation of fava bean concentrate enhanced the water absorption of pasta. From a sensory perspective, formulations containing up to 20% protein concentrate received the most favourable evaluations. Based on the findings, fava bean appears to be a promising ingredient for improving the nutritional profile of pasta products. However, formulation optimization is necessary to balance technological functionality and consumer acceptability.

Keywords: Protein concentrate; pasta; sensory evaluation; nutritional profile

Úvod

V súčasnosti sa výskum aj potravinársky priemysel čoraz intenzívnejšie zameriavajú na zvyšovanie výživovej hodnoty potravín prostredníctvom využívania rastlinných bielkovín, čo súvisí so stúpajúcim dopytom po zdravších a udržateľnejších produktoch (Alcorta et al., 2021). Bielkoviny ako základné zložky potravinových systémov prispievajú nielen k nutričnej hodnote, ale aj k štruktúre a funkčným vlastnostiam výrobkov. V tejto súvislosti sa čoraz častejšie využívajú bielkovinové izoláty a koncentráty rastlinného pôvodu, ktoré sa vyznačujú vysokým obsahom esenciálnych aminokyselín a priaznivými funkčnými vlastnosťami, ako je schopnosť emulgácie či viazať vodu (Sharif et al., 2022). Strukoviny predstavujú významný zdroj rastlinných bielkovín, ktorých obsah sa pohybuje v rozmedzí 20 - 42 %. Vzhľadom na ich aminokyselinové zloženie, najmä prítomnosť lyzínu, sú vhodným doplnkom cereálnych surovín, ktoré sú v tejto aminokyseline limitované (Singh et al., 2025). Cestoviny patria medzi najrozšírenejšie obilninové výrobky a sú významným zdrojom energie. Tradične sa vyrábajú zo semoliny, múky z tvrdej pšenice, ktorá zabezpečuje ich štruktúru a stabilitu počas varenia. Z odbornej literatúry vyplýva, že prídavok strukovinových bielkovín môže modifikovať kvalitatívne, nutričné parametre a senzorické charakteristiky cestovín (Wee et al., 2019; Hoehnel et al., 2023), preto cieľom tejto práce bolo posúdiť vplyv prídavku bielkovinového koncentrátu z fava fazule na tieto vlastnosti.

Materiál

Kontrolná vzorka: komerčne dostupná múka z tvrdej pšenice (F.LLI Matromauro s.p.a., Corato, Taliansko), (chemické zloženie na 100 g: 12,8 g bielkovín, 71,2 g sacharidov, 1 g tuku, 2,6 g vlákniny, 0,004 g soli). Bielkovinový koncentrát z fava fazule (obsah bielkovín 56 %) poskytla spoločnosť DONAUCHEM s.r.o. (Senec, Slovensko). Kompozitné múčne zmesi boli

pripravené náhradou múky z tvrdej pšenice bielkovinovým koncentrátom z fava fazule v podieloch 10, 20, 30 a 40 % (označené ako F10–F40).

Metodika

Cestoviny boli pripravené podľa modifikovaného postupu autorov Wee et al. (2019). V laboratórnom lise na cestoviny (GGM Gastro International GmbH, Nemecko) sa 200 g suchých surovín (semolina a bielkovinový koncentrát) zmiešalo s vodou a miesilo 30 minút. Cesto sa následne vytlačalo cez matricu typu „pappardelle“ (šírka 16 mm).

Kvalitatívne vlastnosti uvarených cestovín, ako sú optimálny čas varenia (OCT), index napučievania (SI), straty varením (CL) a absorpcia vody (WA) boli stanovené podľa metodiky opísanej autormi Chettrariu a Dabija (2021).

Obsah bielkovín bol stanovený meraním celkového obsahu dusíka Kjeldahlovou metódou (Rizvi et al., 2022). Celková energetická hodnota spolu s ďalšími parametrami, ako je obsah tuku a celkových sacharidov, bola stanovená podľa štúdie autorov Holkovičová et al. (2025); tieto výsledky však nie sú súčasťou prezentovanej práce.

Senzorické hodnotenie bolo realizované jedenásťčlennou vyškolenou skupinou panelistov, ktorá posudzovala farbu, vôňu, chuť, textúru a celkovú akceptovateľnosť uvarených cestovín pomocou päťbodovej hedonickej stupnice (1 – veľmi neprijateľné, 5 – veľmi prijateľné) podľa štúdie autorov El-Sohaimy et al. (2020).

Analýzy sa vykonali trikrát a výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ smerodajná odchýlka. Štatistická významnosť rozdielov bola posúdená pomocou ANOVA pri hladinách $p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$, pričom na porovnanie skupín sa použil Fisherov LSD test. Výpočty sa realizovali v programe Statgraphics 19 (Statsoft-Inc., The Plains, VA, USA).

Výsledky a diskusia

Výsledky ukázali, že prídavok bielkovinového koncentráta z fava fazule významne ovplyvnil kvalitatívne parametre cestovín (Tab. 1).

Tabuľka 3: Kvalitatívne vlastnosti cestovín.

	OCT (min)	WA (g/100g)	CL (%)	SI (g H ₂ O/100g)
KV	9,80 $\pm$ 0,28	120,15 $\pm$ 1,85	4,23 $\pm$ 0,14	1,45 $\pm$ 0,03
F10	10,10 $\pm$ 0,14	123,62 $\pm$ 1,69*	3,60 $\pm$ 0,54	1,61 $\pm$ 0,02**
F20	10,30 $\pm$ 0,07*	124,85 $\pm$ 5,34*	5,42 $\pm$ 0,29	1,68 $\pm$ 0,01***
F30	11,08 $\pm$ 0,11***	137,81 $\pm$ 1,61***	5,82 $\pm$ 0,23*	1,82 $\pm$ 0,02***
F40	11,13 $\pm$ 0,04***	155,35 $\pm$ 4,15***	6,58 $\pm$ 0,44**	2,10 $\pm$ 0,02***

*, **, *** označujú štatisticky významný rozdiel na hladinách významnosti $p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$; F – bielkovinový koncentrát z fava fazule, F10–F40 – podiel F v kompozitných múčnych zmesiach, KV – pšeničná múka, OCT – optimálny čas varenia, WA – absorpcia vody, CL – straty varením SI – index napučievania

OCT sa s rastúcim podielom koncentráta predlžoval, čo možno pripísať zníženému obsahu škrobu v kompozitnej zmesi a vyššiemu obsahu bielkovín, ktoré bránia prenikaniu vody do štruktúry cestovín počas varenia (Bresciani et al., 2022). Ďalej bol preukázaný štatisticky významný rozdiel medzi parametrom CL pre cestoviny s vyšším prídavkom koncentráta z fazule (F30, F40) a KV. Tento jav možno pripísať narušeniu lepkovej siete, keďže bezlepkové bielkoviny strukovín netvoria súdržnú maticu, ktorá by počas varenia udržiavala integritu

štruktúry (Garcia-Valle et al., 2021). WA, parameter ktorý predstavuje schopnosť cestovín absorbovať vodu počas varenia, sa výrazne zvýšil u všetkých vzoriek inkorporovaných cestovín. Vyššia hodnota WA zvyčajne súvisí s vyšším obsahom vlákniny alebo poréznejšou štruktúrou, čo následne ovplyvňuje textúru finálneho produktu. Zvýšená absorpcia vody môže prispieť aj k zlepšeniu textúry tým, že cestoviny získajú mäkšiu a súdržnejšiu konzistenciu (Desai et al., 2018). SI vyjadruje schopnosť cestovín zväčšiť svoj objem počas varenia. Vyššia hodnota SI naznačuje vyššiu schopnosť viazať vodu, čo sa premieta do priaznivejšej textúry a senzorickej akceptovateľnosti cestovín (Gull et al., 2018). Hodnoty SI vzoriek obsahujúcich koncentrát sa výrazne zvýšili, čo je v súlade so zisteniami autorov Sharif et al. (2022), podľa ktorých cestoviny obohatené o strukovinové bielkoviny vykazovali vyššiu schopnosť napučiavať v dôsledku ich interakcie medzi s vodou.

Tabuľka 4: Obsah bielkovín v pripravených cestovinách.

	Bielkoviny (g/100 g)	Bielkoviny (% z celkovej energie)
KV	12,15±0,27	14,11
F10	13,57±0,12***	16,13
F20	18,51±0,20***	22,52
F30	22,65±0,24***	26,46
F40	25,65±0,18***	29,17

*, **, *** označujú štatisticky významný rozdiel na hladinách významnosti $p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$; F – bielkovinový koncentrát z fava fazule, F10–F40 – podiel F v kompozitných múčnych zmesiach, KV – pšeničná múka.

Obsah bielkovín predstavuje kľúčový nutričný parameter, ktorý významne prispieva k celkovej výživovej hodnote potravinového produktu (Berrazaga et al., 2020). Kontrolná vzorka semolinových cestovín obsahovala 12,15 % bielkovín, zatiaľ čo obohatenie cestovín bielkovinovými koncentrátmi z fava fazule viedlo k významnému zvýšeniu obsahu bielkovín. Na základe týchto údajov možno formulácie cestovín s viac ako 20 % prídavkom fazuľového koncentráta v tejto štúdii klasifikovať podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 (Nariadenie EC, 2006) ako potraviny s vysokým obsahom bielkovín (t.j. ak potravina obsahuje minimálne 20 % energetickej hodnoty z bielkovín) (Tab 2).

Senzorické hodnotenie cestovín nepreukázalo štatisticky významné rozdiely v celkovej akceptovateľnosti cestovín s 10 a 20 % prídavkom bielkovinového koncentráta z fava fazule s semolinovými cestovinami. Výrobky s vyšším podielom koncentráta sa vyznačovali intenzívnou strukovinovou chuťou a vôňou.

Záver

Získané výsledky potvrdzujú, že prídavok bielkovinového koncentráta z fava fazule významne zvyšuje nutričnú hodnotu cestovín vďaka vyššiemu obsahu bielkovín a zlepšenej schopnosti viazať vodu. Zároveň však dochádza k zmenám technologických a senzorických parametrov, najmä pri vyšších podieloch, čo poukazuje na potrebu optimalizácie receptúry s cieľom zachovať vyvážené kvalitatívne vlastnosti finálneho produktu.

Podakovanie

Štúdia bola finančne podporená v rámci Grantovej schémy na podporu excelentných tímov mladých výskumníkov STU č. 1631.

Literatúra

ALCORTA, A., PORTA, A., TÁRREGA, A., ALVAREZ, M. D., VAQUERO, M. P. 2021. Foods for plant-based diets: challenges and innovations. In *Foods*, vol. 10, no. 2, pp. 1-23. ISSN 2304-8158.

BERRAZAGA, I.; BOURLIEU-LACANAL, C.; LALEG, K.; JARDIN, J.; BRIARD-BION, V.; DUPONT, D.; MICARD, V. Effect of protein aggregation in wheat-legume mixed pasta diets on their in vitro digestion kinetics in comparison to “rapid” and “slow” animal proteins. *PLoS One*. 2020, vol. 15, no. 5, art. no. e0232425.

BRESCIANI, A.; PAGANI, M.A.; MARTI, A. Pasta-making process: a narrative review on the relation between process variables and pasta quality. *Foods*. 2022, vol. 11, no. 3, art. no. 256.

CHESTRARIU, A.; DABIJA, A. Quality characteristics of spelt pasta enriched with spent grain. *Agronomy*. 2021, vol. 11, no. 9, art. no.1824.

DESAI, A.; BRENNAN, M.A.; BRENNAN, C.S. The effect of semolina replacement with protein powder from fish (*Pseudophycis bachus*) on the physicochemical characteristics of pasta. *LWT- Food Science and Technology*. 2018, vol. 89, s. 52-57.

EL-SOHAIFY, S. A., BRENNAN, M., DARWISH, A. M., BRENNAN, C. Physicochemical, texture and sensorial evaluation of pasta enriched with chickpea flour and protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*. 2020, vol. 65, no. 1, s. 28-34.

GARCIA-VALLE, D.E.; BELLO-PÉREZ, L.A.; AGAMA-ACEVEDART, E.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Structural characteristics and in vitro starch digestibility of pasta made with durum wheat semolina and chickpea flour. *LWT- Food Science and Technology*. 2021, vol. 145, art. no. 111347.

GULL, A.; PRASAD, K.; KUMAR, P. Nutritional, antioxidant, microstructural and pasting properties of functional pasta. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2018, vol. 17, no. 2, s. 147-153.

HOEHNEL, A.; BEZ, J.; AMAROWICZ, R.; ARENDT, E.K.; ZANNINI, E. Combining high-protein ingredients from pseudocereals and legumes for the development of fresh high-protein hybrid pasta: maintained technological quality and adequate sensory attributes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2022, vol. 102, no. 12, s. 4977-4987.

HOLKOVIČOVÁ, T.; KOHAJDOVÁ, Z.; LAUKOVÁ, M.; MINAROVÍČOVÁ, L.; STARUCH, L. Impact of lupin inclusion on the rheological and qualitative characteristics, and sensory acceptability of baked rolls. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2025, vol. 75, no. 1, s. 5-15.

Nariadenie (ES) č. 1924/2006 Európskeho parlamentu a Rady z 20. decembra 2006 o výživových a zdravotných tvrdeniach pri potravinách.

RIZVI, N.B.; ALEEM, S.; KHAN, M.R.; ASHRAF, S.; BUSQUETS, R. Quantitative estimation of protein in sprouts of *Vigna radiate* (Mung beans), *Lens culinaris* (Lentils), and *Cicer arietinum* (Chickpeas) by Kjeldahl and Lowry methods. *Molecules*. 2022, vol. 27, no. 3, art. no. 814.

SHARIF, M.K.; SALEEM, M.; SHARIF, H.R.; SALEEM, R. 2022. Enrichment and fortification of traditional foods with plant protein isolates. In *Plant protein foods*, Cham: Springer International Publishing. 519 p. ISBN 9783030912062.

SINGH, A.K.; ELANGO, D.; RAIGNE, J.; VAN DER LAAN, L.; RAIRDIN, A.; SOREGAON, C.; SINGH, A. Plant-based protein crops and their improvement: current status and future perspectives. *Crop Science*. 2025, vol. 65, no. 1, e21389.

WEE, M.S.M.; LOUD, D.E.; TAN, V.W.K.; FORDE C.G. Physical and sensory characterisation of noodles with added native and denatured pea protein isolate. *Food Chemistry*. 2019, vol. 294, s. 152-159.

Kontaktná adresa: Tatiana Holkovičová, Ing., Oddelenie potravinárskej technológie, Ústav potravinárstva a výživy, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, tatiana.holkovicova@stuba.sk

Vplyv prídavku jablkovej vlákniny na kvalitatívne parametre a senzorické vlastnosti bezlepkových sušienok

The effect of apple fiber addition on the quality parameters and sensory evaluation of gluten-free cookies

Viktória Píri, Tatiana Holkovičová, Lucia Minarovičová, Michaela Lauková, Zlatica Kohajdová

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave

Summary

In modern times, consumer interest in gluten-free cereal products is increasing. This trend is driven both by the growing proportion of the population affected by gluten-associated disorders and by a large number of consumers who prefer this type of food. These products are typically characterized by a low fiber content; therefore, incorporating fiber into gluten-free products may contribute to enhancing their nutritional profile. The aim of this study was to assess the effect of commercially available apple fiber addition (0–5% based on flour weight) on the quality parameters and sensory characteristics of gluten-free cookies made from corn flour. The incorporation of fiber significantly affected cookie dimension, volume, volume index, and specific volume of the products. Sensory evaluation showed significant differences in odour, colour and hardness of the cookies incorporated with apple fiber compared to the corn flour control sample.

Keywords: *gluten-free, cookies, apple fiber, qualitative characteristics, sensory evaluation*

Úvod

Celiakia je autoimunitné ochorenie tenkého čreva vyvolané požitím lepku – bielkovinového komplexu obsiahnutého v pšenici, jačmeni a raži (Simón et al., 2023). Jedinou účinnou liečbou je prísne a celoživotné dodržiavanie bezlepkovej diéty, čo si vyžaduje zásadnú zmenu stravovacích návykov (Mazzola et al., 2024). Lepok, tvorený hlavne gliadínom a glutenínom, dodáva pšeničnému cestu pružnosť a ťažnosť. Práve preto z technologického hľadiska jeho absencia predstavuje výzvu pri formulácii bezlepkových produktov a je potrebné hľadať nové alternatívy, ktoré ho dokážu nahradiť v bezlepkových výrobkoch (Aljada et al., 2021). Jednou z nich sa javí prídavok jablkovej vlákniny, ktorá svojimi funkčnými vlastnosťami prispieva k zlepšeniu kvality týchto produktov. Jej prídavok do bezlepkových potravinárskych výrobkov prispieva k zlepšeniu textúry a senzorických vlastností finálnych produktov (Lyu et al., 2020). Predmetom tejto štúdie je skúmanie vplyvu prídavku jablkovej vlákniny na kvalitatívne parametre a senzorické vlastnosti bezlepkových sušienok vyrobených na báze kukuričnej múky.

Materiál

Kukuričná múka (Kroner, s.r.o., Slovensko) s obsahom 10,4 g bielkovín, 1,9 g tuku, 81,4 g sacharidov a 3,7 g vlákniny na 100 g produktu. Jablková vláknina s obsahom 8,39 g bielkovín, 5,73 g tuku a 12,10 g sacharidov na 100 g produktu (Natural Jihlava, Slovensko). Ostatné suroviny (margarín, vajcia, sacharóza, prášok do pečiva) boli zakúpené v miestnych obchodoch s potravinami.

Príprava sušienok

Sušienky boli pripravené podľa receptúry uvedenej v tabuľke č 1. Pri výrobe sušienok bolo 1 %, 3 % a 5 % z receptúrneho množstva kukuričnej múky nahradených jablkovou vlákninou. Pri

výrobe sušienok boli použité nasledujúce technologické operácie: zmiešanie surovín, vypracovanie cesta, valkanie cesta na hrúbku 1 cm a tvarovanie (priemer 5 cm). Následne sa sušienky piekli 15 minút pri 160°C v teplovzdušnej rúre. Po upečení sa sušienky nechali vychladnúť a použili sa na ďalšiu analýzu (Akubor a Oniwano, 2003).

Tabuľka 1: Základná receptúra na výrobu sušienok		
Surovina	Percentuálne zastúpenie (%)	Návažok (g)
Kukuričná múka	49,5	300
Margarín	20	121,2
Vajcia	10	60,6
Sacharóza	20	121,2
Prášok do pečiva	0,5	3

Stanovenie kvalitatívnych parametrov sušienok

V tejto práci boli stanovené nasledujúce kvalitatívne parametre: straty pečením a objem sušienok (Minarovičová et al., 2018), objemový index a hustota (Mala et al., 2024), špecifický objem (Ma a Baik, 2018) a výška a šírka (Lauková et al., 2019).

Senzorické hodnotenie sušienok

Senzorické hodnotenie sušienok sa uskutočnilo na základe postupu podľa Akubor a Oniwano (2003). Hodnotenie vykonalo 13 hodnotiteľov, ktorí ohodnotili nasledujúce senzorické vlastnosti: chuť, vôňa, tvar, tvrdosť a farba produktov pomocou 7-bodovej hedonickej stupnice (0 – neprijateľná, 7 – veľmi prijateľná).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Všetky stanovenia sa vykonali trikrát a výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ smerodajná odchýlka. Štatisticky významné rozdiely boli posúdené pomocou ANOVA pri hladinách $p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$, pričom na porovnanie skupín bol použitý Fisherov LSD test. Výpočty boli uskutočnené v programe Statgraphics 19 (Statsoft-Inc., The Plains, VA, USA).

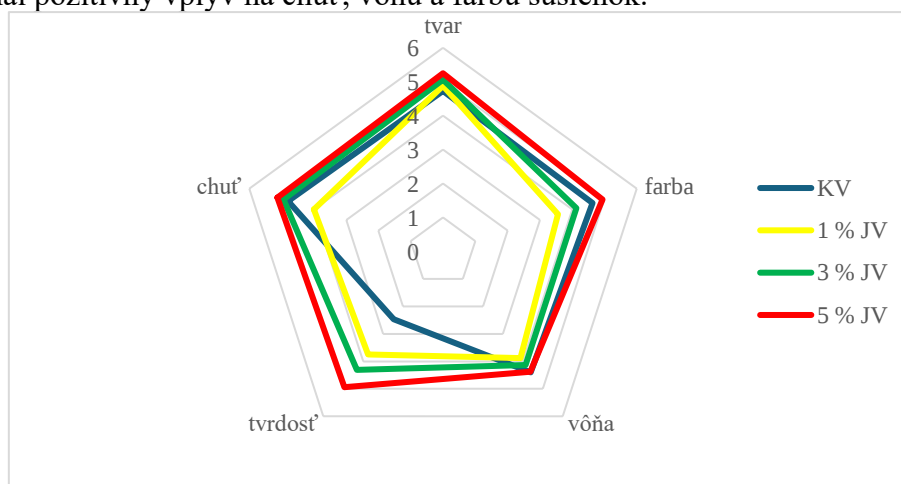
Výsledky a diskusia

Tabuľka 2 znázorňuje výsledky hodnotenia kvalitatívnych parametrov bezlepkových sušienok na báze kukuričného škrobu s prídavkom jablkovej vlákniny.

Tabuľka 2: Kvalitatívne parametre sušienok s prídavkom jablkovej vlákniny				
		Prídavok jablkovej vlákniny (%)		
	KV	1	3	5
Straty pečením (%)	19,73 $\pm$ 0,56	16,41 $\pm$ 0,45**	15,55 $\pm$ 0,89**	15,19 $\pm$ 0,48***
Objem (cm ³)	15,33 $\pm$ 0,42	14,97 $\pm$ 0,55	14,73 $\pm$ 0,29*	11,67 $\pm$ 0,15***
Objemový index (cm)	2,49 $\pm$ 0,12	3,00 $\pm$ 0,08**	2,91 $\pm$ 0,13**	2,68 $\pm$ 0,16*
Špecifický objem (cm ³ .100 g ⁻¹)	173,70 $\pm$ 1,77	144,46 $\pm$ 2,97**	144,37 $\pm$ 3,73**	118,38 $\pm$ 5,74***
Výška (cm)	0,92 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,01*	0,85 $\pm$ 0,02**	0,83 $\pm$ 0,01**
Šírka (cm)	4,59 $\pm$ 0,03	4,45 $\pm$ 0,09**	4,36 $\pm$ 0,08***	4,30 $\pm$ 0,05***
Hustota (g.cm ⁻³)	0,58 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,02**	0,69 $\pm$ 0,02**	0,85 $\pm$ 0,04***

KV – kontrolná vzorka; *, **, *** indikuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) oproti kontrolnej vzorke

Na základe výsledkov možno konštatovať, že prídavok jablkovej vlákniny mal štatisticky významný vplyv na kvalitatívne parametre sušienok. Bolo zistené, že pri sušienkach s prídavkom vlákniny sa straty pečením výrazne znížili (15,19-16,41 %) v porovnaní s kontrolnou vzorkou (19,73 %). Tento pokles môže byť spôsobený zvýšenou schopnosťou jablkovej vlákniny viazať vodu, čím sa znižuje úbytok hmotnosti počas pečenia (Fidriyanto et al., 2023). Objem patrí medzi kľúčové ukazovatele kvality pekárenských výrobkov (Fartellini et al., 2018). So zvyšujúcim sa podielom vlákniny v sušienkach bol pozorovaný výraznejší pokles objemu a špecifického objemu sušienok. Najvyššie hodnoty boli namerané pri kontrolnej vzorke ($15,33 \text{ cm}^3$ a $173,70 \text{ cm}^3 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), zatiaľ čo pre sušienky s 5 % obsahom jablkovej vlákniny tieto parametre predstavovali $11,67 \text{ cm}^3$ resp. $118,38 \text{ cm}^3 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Súbežne s tým bol zaznamenaný nárast hustoty ($0,58 - 0,85 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), zníženie výšky ($0,92 \text{ cm} - 0,83 \text{ cm}$) a šírky ($4,59 \text{ cm} - 4,30 \text{ cm}$) sušienok, čo je v súlade s výsledkami autorov Salari et al. (2024). Daní autori tento efekt vysvetľujú tým, že vlákna naviaže na seba vodu a ovplyvňuje aj proces mazovania škrobu, čo vedie k menšej expanzii výrobkov. Obrázok 1 znázorňuje výsledky sensorického hodnotenia sušienok. Sensorické hodnotenie ukázalo, že prídavok jablkovej vlákniny mal pozitívny vplyv na chuť, vôňu a farbu sušienok.



Obrázok 1: Sensorické hodnotenie kukuričných sušienok s prídavkom 1 %, 3 %, 5 % jablkovej vlákniny

KV – kontrolná vzorka, JV – jablková vláknina

Najvyššie bodové ohodnotenie chuti vykazovala vzorka s 5 % prídavkom vlákniny, čo poukazuje na to, že inkorporácia ovocnej vlákniny môže mať priaznivý vplyv na sensorické vlastnosti sušienok. Túto skutočnosť potvrdili vo svojich predchádzajúcich štúdiách aj Naseem et al. (2024). Ďalej bolo zistené, že prídavok jablkovej vlákniny zvýšil tvrdosť sušienok. Autori Kruczek et al. (2023) dokumentovali, že zvýšená tvrdosť sušienok inkorporovaných jablkovou vlákninou je zapríčinená jej vysokým podielom nerozpustnej vlákniny (37,32 %), ktorá absorbuje veľké množstvo vody počas miesenia, čím sa zvyšuje tvrdosť cesta, čo ovplyvňuje textúru finálneho produktu.

Záver

Získané výsledky preukázali, že prídavok jablkovej vlákniny významne ovplyvňuje technologické a sensorické vlastnosti bezlepkových sušienok.

Podakovanie

Autori ďakujú STU za finančnú podporu v rámci Grantovej schémy na podporu mladých výskumníkov č. 1603.

Literatúra

AKUBOR, P. I.; ONIMAWO, I. A. Functional properties and performance of soybean maize flour lends in cookies. *Plant Food for Human Nutrition*. 2003, vol. 58, no. 1, s. 1-12.

ALJADA, B.; ZOHNI, A.; EL-MATARY, W. The gluten-free diet for celiac disease and beyond. *Nutrients*. 2021, vol. 13, no. 11, 3993.

FARTELLINI, C.; MUNIZ, D. G.; SANTOS, F. G.; CAPRILES, V. D. Modelling the effects of psyllium and water in gluten-free bread: An approach to improve the bread quality and glycemic response. *Journal of Functional Foods*, 2018, vol. 42, s. 339-345.

FIDRIYANTO, R.; SINGH, B. P.; MANJU, K. M.; WIDYASTUTI, Y.; GOEL, G. Multivariate analysis of structural and functional properties of fibres from apple pomace using different extraction methods. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2023, vol. 5, no. 6

KRUCZEK, M.; GUMUL, D.; KORUS, A.; BUKSA, K.; ZIOBRO, R. Phenolic compounds and antioxidant status of cookies supplemented with apple pomace. *Antioxidants*. 2023. vol. 12, no. 2, 324.

LAUKOVÁ, M.; MINAROVIČOVÁ, L.; KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Quality evaluation of sweet potato powder-enriched cereal products. *Food Science and Technology International*. 2019, vol. 25, no. 6, s. 523-532.

LYU, F.; LUIZ, S. F.; AZEREDO, D. R. P.; CRUZ, A. G.; AJLOUNI, S.; RANADHEERA, Ch. S. Apple pomace as a functional and healthy ingredient in food products: a review. *Processes*. 2020, vol. 8, no. 3, 319.

MA, F.; BAIK, B. Soft wheat quality characteristics required for making baking powder biscuits. *Journal of Cereal Science*. 2018, vol. 79, s. 127-133.

MALA, T.; PIAYURA, S.; ITTHIVADHANAPONG, P. Characterization of dried pineapple (*Ananas comosus* L.) peel powder and its application as a novel functional food ingredient in cracker product. *Future Foods*. 2024, vol. 9, 100322.

MAZZOLA, A. M.; ZAMMARCHI, I.; VALERII, M. Ch.; SPISNI, E.; SARACINO, I. M.; LANZAROTTO, F.; RICCI, Ch. Gluten-free diet and other celiac disease therapies: current understanding and emerging strategies. *Nutrients*. 2024, vol. 16, no. 7, 1006.

MINAROVIČOVÁ, L.; LAUKOVÁ, M.; KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Utilization of pumpkin powder in baked rolls. *Potravinárstvo*. 2018, vol. 12, no. 1, s. 195-201.

NASEEM, Z.; BHAT, N. A.; MIR, S. A. Valorisation of apple pomace for the development of high-fibre and polyphenol-rich wheat flour cookies. *Scientific Reports*. 2024, vol. 14, 25912.

SALARI, S.; CASTIGLIEGO, T.; FERRERIA, J.; LIMA, A.; SOUSA, I. Development of healthy and clean-label crackers incorporating apple and carrot pomace flours. *Sustainability*. 2024, vol. 16, no. 14, 5995.

SIMÓN, E.; MOLERO-LUIS, M.; FUEYO-DÍAZ, R.; COSTAS-BATLLE, C.; CRESPO-ESCOBAR, P.; MONTORO-HUGUET, M. A. The gluten-free diet for celiac disease: critical insights to better understand clinical outcomes. *Nutrients*. 2023, vol. 15, no. 18, 4013.

Kontaktná adresa: Viktória Piri, Ing., Ústav potravinárstva a výživy, Oddelenie potravinárskej technológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, viktor.piri@stuba.sk

Vliv pořadí laktace a sezónnosti na obsah laktoferinu v kravském mléce

The influence of lactation order and seasonality on lactoferrin content in cow's milk

¹Pospíšil Jan, ¹Bartáková Klára, ¹Vorlová Lenka, ²Hanuš Oto, ¹Navrátilová Pavlína

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

²Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Summary

Lactoferrin is a representative of non-heme iron-binding glycoproteins, so-called transferrins. It has antibacterial, antiviral and antiparasitic activity and is a significant, naturally occurring inhibitory substance in milk. This work deals with the influence of season and lactation order on the content of lactoferrin in cow's milk. Individual milk samples ($n = 90$) were collected from farms in the Czech Republic, in the region of North Moravia. The samples were collected in March ($n = 30$), June ($n = 30$) and September ($n = 30$) of 2023. Two breeds were chosen for the experiment, Czech Fleckvieh and Holstein cattle. Lactoferrin was determined by high-performance liquid chromatography using a photo diode array detector. The determined content of lactoferrin ranged from 28.9 to 792.6 mg.l⁻¹ and the average content was 182.4 ± 138.4 mg.l⁻¹. The median of the analyzed data set was 137.9 mg.l⁻¹. Analysis of the measured data revealed that neither the order of lactation nor seasonality has a statistically significant effect on the concentration of lactoferrin in milk. Analysis of the influence of other parameters that may be related to the content of lactoferrin is part of ongoing scientific research projects of the institute.

Keywords: transferrins; seasonality; order of lactation; Czech Fleckvieh; Holstein cattle

Úvod

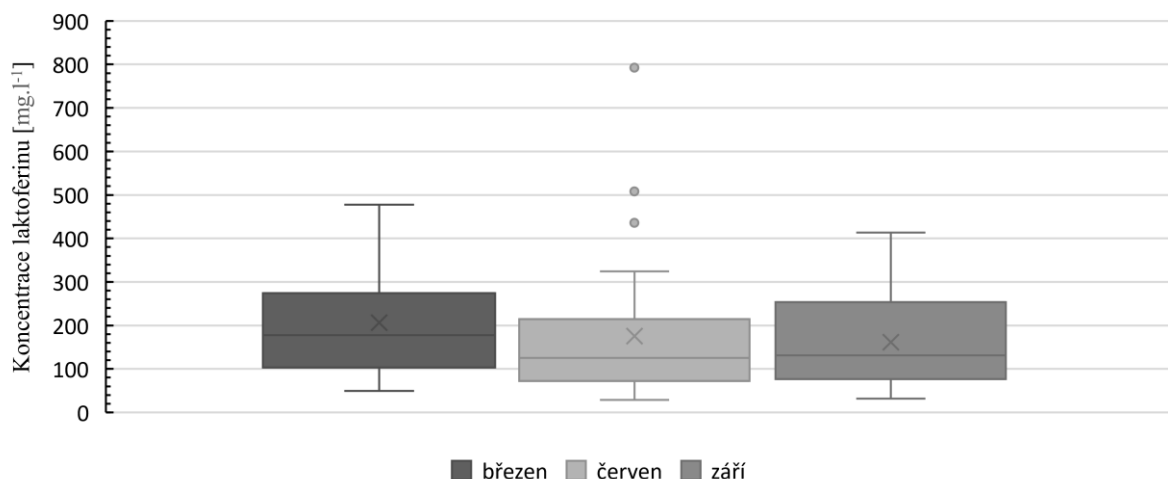
Laktoferin je zástupcem nehemových glykoproteinů vázajících železo, tzv. transferinů. Má antibakteriální, antivirovou a antiparazitární aktivitu a je významnou, přirozeně se vyskytující inhibiční látkou mléka. Laktoferin je součástí imunitní odpovědi organismu, a proto může být potenciálním indikátorem onemocnění mléčné žlázy, například mastitid (Navrátilová et al., 2022; Barłowska et al., 2024). Laktoferin může inhibovat růst gramnegativních bakterií prostřednictvím své schopnosti vázat železné ionty, nebo přímým usmrcováním určitých bakteriálních kmenů (Rainard et Riollot, 2006). Kromě imunologické funkce v mléčné žláze dojného skotu je koncentrace laktoferinu zajímavá také kvůli jeho dalším účinkům, jako jsou například protizánětlivé a antioxidační účinky, či schopnost inhibovat buněčné dělení (Nayeri et al., 2020), včetně některých nádorových onemocnění u lidí. (Duarte et al., 2011).

Materiál a metody

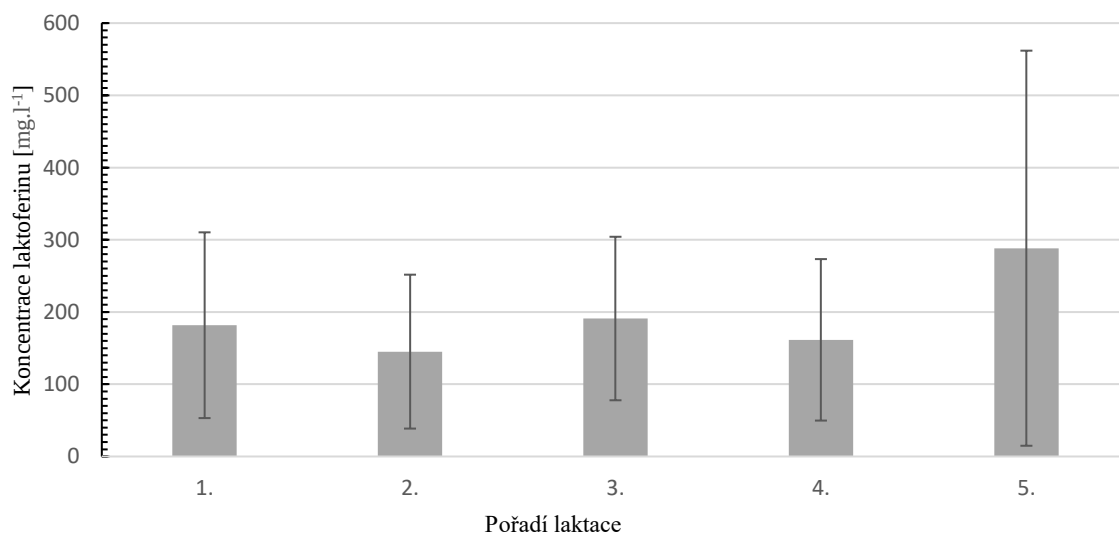
Odběr individuálních vzorků mléka ($n = 90$) proběhl v chovech na území České republiky, v oblasti severní Moravy. Odběry byly prováděny v březnu ($n = 30$), červnu ($n = 30$) a září ($n = 30$) roku 2023. Pořadí laktace u sledovaných dojnic se pohybovalo v rozmezí 1 – 5. Laktoferin byl stanovován metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie na přístroji Alliance 2695 (Waters Corporation, USA) s kolonou Poroshell 300SB-C8, 2,1 x 75 mm, 5 μ m (Agilent Technologies, USA) s využitím gradientové eluce a detekcí analytu na detektoru fotodiodového pole PDA 2996 (Waters Corporation, USA) při 205 nm. Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitrilu, kyseliny trifluoroctové a vody. Průtok mobilní fáze kolonou činil 1,0 ml.min⁻¹ a kolonová sekce byla temperována na 50 °C. Úprava vzorku mléka před vlastní chromatografickou detekcí spočívá v odtužení, následném vysrážení přídavkem 10% kyseliny octové do bodu pH 4,6, odstředění syrovátky a její filtraci pomocí stříkačkového filtru o velikosti pórů 0,22 μ m. Objem nástřiku vzorku z vialky na kolonu činil 5 μ l.

Výsledky

Stanovený obsah laktoferinu v celkovém souboru vzorků se pohyboval v rozpětí 28,9 – 792,6 mg.l⁻¹. Průměrný obsah činil 182,4 ± 138,4 mg.l⁻¹ a medián analyzovaného souboru dat činí 137,9 mg.l⁻¹. V jarním období se koncentrace pohybovala v rozpětí 49,2 – 477,8 mg.l⁻¹, průměrná koncentrace laktoferinu činila 208,7 ± 125,7 mg.l⁻¹ a medián 185,0 mg.l⁻¹. V letním období byl rozsah naměřených koncentrací výrazně širší a pohyboval se v rozpětí 28,9 – 792,6 mg.l⁻¹. Průměrná hodnota laktoferinu činila v letním období 175,9 ± 166,0 a medián 123,8 mg.l⁻¹. V podzimním období se obsah laktoferinu pohyboval v podobném množství jako na jaře, konkrétně v rozpětí 31,5 – 413,5 mg.l⁻¹. Průměrná hodnota laktoferinu v podzimním období činila 163,3 ± 112,4 a medián 132,5 mg.l⁻¹. Statistickou analýzou naměřených dat bylo zjištěno, že pořadí laktace ani sezónnost nemá statisticky významný vliv na koncentraci laktoferinu v mléce. Skutečnost že mezi jednotlivými obdobími není patrný významný rozdíl v obsahu laktoferinu lze odvodit i z krabicového grafu č. 1. průměrných hodnot za jednotlivá odběrová období. Obdobně graf č. 2 odpovídá výsledku statistické analýzy, tj. mezi jednotlivými skupinami dojnic rozdělených dle pořadí laktace není statisticky významný rozdíl.



Graf 1: Koncentrace laktoferinu ve sledovaných obdobích laktace



Graf 2: Koncentrace laktoferinu v závislosti na pořadí laktace dojnice

Diskuse

Barlowska et al. ve své práci z roku 2024 uvádí průměrnou hodnotu laktoferinu v mléce Holštýnského skotu $96,8 \pm 19,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Tato hodnota je výrazně nižší než námi zjištěných $182,4 \pm 138,4 \text{ mg.l}^{-1}$, což odpovídá tomu, že v rámci našeho pokusu byly odebírány vzorky i od zvířat s podezřením na subklinické formy mastitid. Tang et al. ve své práci z roku 2023, zabývající se vlivem sezóny, typu chovu, plemene a zdraví mléčné žlázy na obsah šesti bioaktivních proteinů v mléce, uvádí následující hodnoty laktoferinu: $14,4 \text{ mg.100 g}^{-1}$ (jaro), $13,4 \text{ mg.100 g}^{-1}$ (léto) a $15,3 \text{ mg.100 g}^{-1}$ (podzim). Po přepočtu pomocí hustoty tedy uvedené koncentrace činí $148,8 \text{ mg.l}^{-1}$ (jaro), $138,4 \text{ mg.l}^{-1}$ (léto) a $158,0 \text{ mg.l}^{-1}$ (podzim) oproti námi stanoveným hodnotám $208,7 \text{ mg.l}^{-1}$ (jaro), $175,9 \text{ mg.l}^{-1}$ (léto) a $163,3 \text{ mg.l}^{-1}$ (podzim). Z hodnot je patrné, že v prvních dvou obdobích probíhá v obou prováděných pokusech stejný trend poklesu laktoferinu na nižší letní hodnoty. V podzimním období se trend již rozchází, nicméně průměrná hodnota v tomto období se velmi blíží hodnotě, kterou stanovili Tang et al.

Závěr

Stanovený obsah laktoferinu se pohyboval v rozpětí $28,9 - 792,6 \text{ mg.l}^{-1}$ a průměrný obsah činil $182,4 \pm 138,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Medián analyzovaného souboru dat má hodnotu $137,9 \text{ mg.l}^{-1}$. Analýzou naměřených dat bylo zjištěno, že pořadí laktace ani sezónnost nemá statisticky významný vliv na koncentraci laktoferinu v mléce. Analýza vlivu dalších parametrů, které mohou mít vztah k obsahu laktoferinu, je součástí dalších projektových vědecko-výzkumných prací.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena z projektu NAZV QK21010326.

Literatura

- BARLOWSKA, J.; WÓJCIK-SAGANEK, A.; LITWINCZUK, Z.; BRODZIAK, A.; TETER, A.; KEDZIERSKA-MATYSEK, M. Nutritional value and technological parameters of milk from organic and conventional farms in Poland. *Annals of Animal Science*. 2024, vol. 24, no. 3. s. 949–964. DOI10.2478/aoas-2024-0008.
- DUARTE, D.C.; NICOLAU, A.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *Journal of Dairy Science*. 2011, vol. 94, no. 1, s. 66–76.
- NAVRÁTILOVÁ, P.; VORLOVÁ, L.; BARTÁKOVÁ, K.; BORKOVCOVÁ, I.; HANUŠ, O.; NEJESCHLEBOVÁ, H.; SAMKOVÁ, E. Laktoferin – multifunkční glykoprotein v mléce. *Mlékařské listy – zpravodaj*. 2022, vol. 33, no. 5. s. 1–5.
- NAYERI, S.; SCHENKEL, F.S.; MARTIN, P.; FLEMING, A.; JAMROZIK, J.; MALCHIODI, F.; BRITO, L.F.; BAES, C.F.; SARGOLZAEI, M.; MIGLIOR, F. Estimation of genetic parameters for mid-infrared-predicted lactoferrin and milk fat globule size in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*. 2020, vol. 103, no. 3. s. 2487–2497. DOI10.3168/jds.2019-16850
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res*. 2006. vol. 37, no. 3. s. 369–400. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006007>.
- TANG, S.; ZHANG, L.J.; DUAN, G.X.; WU, L.W.; CHEN, J.; MO, N.; ZHANG, Z.W.; HU, W.H.; LV, Z.Y.; LI, C.Z.; LIU, L.J.; XU, H.Y.; HU, X. Variation of six bioactive milk proteins from milk from Chinese commercial dairy farms: Effect of season, farm, breed and udder health status. *International Journal of Dairy Technology*. 2023, vol. 76, no. 2. s. 339–350. DOI10.1111/1471-0307.12915.

Kontaktní adresa: Jan Pospíšil, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, POSPISILJ@vfu.cz

Modelování vlivu skladovacích podmínek na růstové parametry *Bacillus cereus* ve vařených pšeničných těstovinách

Modeling the effect of storage conditions on growth parameters of *Bacillus cereus* in cooked wheat pasta

Stojanová Kateřina¹, Bursová Šárka¹, Necidová Lenka¹, Bartáková Klára¹,
Haruštiaková Danka², Pechanová Klára¹, Mátl Patrik¹

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

²Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno, Česká republika

Summary

Cooked wheat pasta can be contaminated with an emetic toxin produced by Bacillus cereus, which is resistant to heat and acidic conditions and may cause gastrointestinal symptoms such as nausea and vomiting. This study examined the effect of storage temperature on the growth of toxigenic B. cereus in cooked pasta using primary mathematical models. Growth was monitored at 4, 12, 18, 24, 30, and 36 °C with four collection strains. Samples were analysed regularly, and the data were used to develop growth models and assess consumer risk. The findings contribute to understanding B. cereus behaviour in food and may support HACCP plan updates.

Keywords: predictive microbiology; Gompertz model; growth rate; lag phase

Úvod

Škrobnaté potraviny jsou běžnou součástí jídelníčku, avšak mohou být kontaminovány emetickým toxinem cereulidem produkovaným bakterií *Bacillus cereus*. Tento toxin je stabilní vůči zahřívání i kyselému prostředí a způsobuje nevolnost či zvracení zpravidla do 1-5 hodin po konzumaci kontaminované potraviny (Meng et al., 2022).

Výskyt *B. cereus* byl zaznamenán například ve vařené rýži (Bursová et al., 2024). Studie od Juneja et al. (2019) představuje model popisující růst této bakterie ze spor během chlazení vařených těstovin.

Mikrobiologická bezpečnost potravin závisí na kontrole růstu patogenů, přičemž prediktivní modely umožňují odhadnout jejich chování v čase a za daných podmínek (Stavropoulou et al., 2019; Taiwo et al., 2024). Cílem této práce bylo pomocí Gompertzova modelu popsat růst *B. cereus* ve vařených pšeničných těstovinách při různých skladovacích teplotách.

Materiál a metody

Pro posouzení růstu *Bacillus cereus* ve vařených pšeničných těstovinách byly použity čtyři toxigenní kmeny, pro každý z nich byla samostatně připravena suspenze spor. Kmeny byly kultivovány na šikmém TSA agaru (pH 7) při 30 °C po dobu 24 hodin, následně přeneseny do sporulačního média (živný agar s glukózou a MnSO₄) v Roux láhvích a inkubovány 6 dní. Spory byly uvolněny pomocí skleněných kuliček a fyziologického roztoku, třikrát promyty odstředěním a výsledná suspenze (10⁸ KTJ·ml⁻¹) byla ošetřena ultrazvukem a skladována při 4 °C. Přítomnost spor byla ověřena mikroskopicky barvením malachitovou zelení.

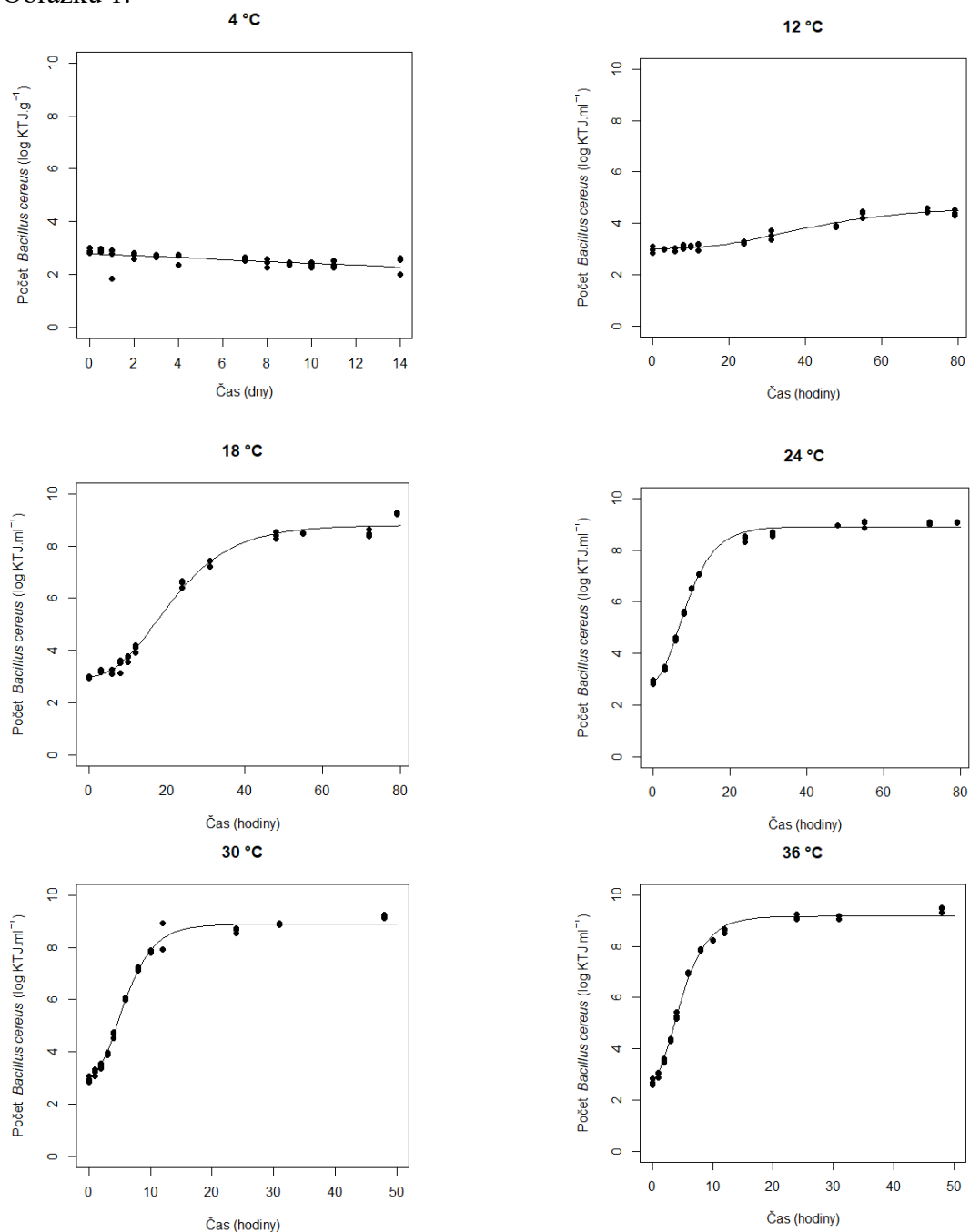
Směsná suspenze kmenů (1:1:1:1) byla zahřáta na 85 °C po dobu 10 minut, zchlazena a naředěna pro inokulaci. Vařené těstoviny byly asepticky rozděleny (10 g/vzorek) do sterilních sáčků a rozděleny podle skladovací teploty (4, 12, 18, 24, 30 a 36 °C). Pro každou teplotu byly připraveny tři inokulované sady a jedna kontrolní. Po inokulaci byla cílová koncentrace *B. cereus* přibližně 10² KTJ·g⁻¹.

Vzorky byly odebrány v různých časových intervalech a analyzovány nanesením 0,2 ml příslušného ředění na povrch MYP agaru (Oxoid Ltd.) a následně kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin.

Naměřené počty ($\text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$) byly logaritmicky transformovány a využity k sestavení růstových modelů. Růst při 4 °C byl popsán lineárním regresním modelem, pro vyšší teploty byl použit Gompertzův model (Gibson et al., 1988; Zwietering et al., 1990). Data byla zpracována v softwaru R s využitím balíčku „nlsMicrobio“ (R Core Team, 2024).

Výsledky a diskuse

Vytvořené růstové křivky *B. cereus* pro jednotlivé skladovací teploty jsou uvedeny na Obrázku 1.



Obrázek 1: Růst *Bacillus cereus* v pšeničných těstovinách charakterizovaný lineárním modelem (při teplotě 4 °C) a nelineárním Gompertzovým modelem (při teplotě 12–36 °C).

Při 4 °C nebyl během 14 dní pozorován růst *B. cereus*, což naznačuje setrvání populace v lag fázi. Se zvyšující se teplotou rostla i rychlost růstu. Při 12 °C dosáhl počet bakterií hodnoty 4,50 log KTJ·g⁻¹ po 79 hodinách, růstovou křivku však nelze považovat za kompletní. Při teplotách nad 18 °C byl zaznamenán plný růst s maximy přes 9 log KTJ·g⁻¹: při 18 °C po 48 h, při 24 °C po 24 h a při 30 a 36 °C již po 12 h.

Podobný trend zaznamenali i Juneja et al. (2019), kdy se se stoupající teplotou zkracovala lag fáze růstu. Srovnatelné výsledky byly naměřeny při teplotách 12 °C vs. 13 °C, 18 °C vs. 19 °C, 24 °C vs. 25 °C, 30 °C vs. 31 °C a 36 °C vs. 37 °C. Na rozdíl od této studie však Juneja et al. (2019) nehodnotili růst při 4 °C, neboť jejich měření začínalo až na 13 °C, a výsledky při této teplotě tak nejsou vzájemně porovnatelné.

Závěr

Pro hodnocení bezpečnosti potravin je zásadní znát růstovou dynamiku patogenních bakterií a vliv teploty na jejich množení. Podle Vyhlášky č. 137/2004 Sb. je nutné vařené pšeničné těstoviny co nejdříve zchladit a uchovávat při teplotě do 4 °C. Ponechání při pokojové teplotě (okolo 20 °C) či vyšší vede během několika hodin k významnému pomnožení *B. cereus* a zvýšenému riziku intoxikace, přičemž růst bakterií urychluje vyšší teplota skladování.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou VETUNI Brno, projekt č. 228/2025/FVHE.

Literatura

BURSOVÁ, Š.; HARUŠTIAKOVÁ, D.; NECIDOVÁ, L.; KROBOTOVÁ, E.; MLEJNKOVÁ, Z.; TKÁČ, M.; STOJANOVÁ, K.; GOLIAN, J. Evaluation of *Bacillus cereus* growth in cooked rice. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2024, vol. 14, no. 1, s. 7.

ČESKÁ REPUBLIKA. Ministerstvo zdravotnictví. Vyhláška č. 137/2004 Sb., o hygienických požadavcích na stravovací služby a o zásadách osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných. Sbírka zákonů České republiky. 2004, částka 44, s. 2485–2491.

GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. Predicting microbial growth – growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 1988, vol. 6, no. 2, s. 155–178.

JUNEJA, V.K.; GOLDEN, C.H.E.; MISHRA, A.; HARRISON, M.A.; MOHR, T.B. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* at temperatures applicable to cooling of cooked pasta. *Journal of Food Science*. 2019, vol. 84, no. 3, s. 590–598.

MENG, J.-N.; LIU, Y.-J.; SHEN, X.; WANG, J. Detection of emetic *Bacillus cereus* and the emetic toxin cereulide in food matrices: Progress and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*. 2022, vol. 123, s. 322–333.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. 2024, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Predictive modeling of microbial behavior in food. *Foods*, 2019, vol. 8, no. 12, s. 654.

TAIWO, O.R.; ONYEAKA, H.; OLADIPO, E.K.; OLOKE, J.K.; CHUKWUGOZIE, D.C. Advancements in predictive microbiology: Integrating new technologies for efficient food safety models. *International Journal of Microbiology*. 2024, vol. 2024, no. 1, s. 21.

ZWIETERING, M.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN, T. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, vol. 56, no. 6, s. 1875–1881.

Kontaktní adresa: Kateřina Stojanová, Bc., Ing., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno, e-mail: stojanovak@vfu.cz

Genetické vlastnosti izolátů MRSA CC398 u zvířat: Porovnání mezi hospodářskými zvířaty, domácími mazlíčky a lidmi

Genetic properties of MRSA CC398 isolates in animals: A comparison between livestock, pets, and humans

¹Brodíková Kristýna, ¹Karpíšková Renáta

¹Ústav veřejného zdraví, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno

Summary

This study analyzes MRSA isolates of clonal complex CC398 obtained from humans, livestock, and companion animals. A genetic distinction between human-associated HO-MRSA and animal-associated LA-MRSA was confirmed, with LA-MRSA isolates also detected in human patients. LA-MRSA were also identified in companion animals, suggesting a broader host adaptability and their significance in the epidemiology of this pathogen.

Keywords: CC398; HO-MRSA; LA-MRSA; genetic analysis

Úvod

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) představuje závažný patogen u lidí, hospodářských zvířat a domácích mazlíčků. První izolace MRSA u zvířat byla popsána v roce 1972 u krav s mastitidou, později se objevila také u prasat. Termín LA-MRSA (livestock-associated MRSA) byl zaveden v souvislosti s výskytem těchto kmenů u prasat v Nizozemsku v roce 2005, přičemž nejčastěji se jednalo o klonální komplex CC398, adaptovaný na zvířecí hostitele.

Domácí mazlíčci představují další možný rezervoár MRSA. U psů a koček byly detekovány jak nemocniční (např. EMRSA-15, CC5, CC8), tak komunitní varianty (např. USA300), u králíků pak specifická linie CC1. Prevalence MRSA u domácích mazlíčků dosahuje 3,6–5,7 %, což poukazuje na potenciální riziko přenosu na člověka.

Kromě LA-MRSA zahrnuje klonální komplex CC398 také izoláty lidského původu (HO-MRSA), které se odlišují přítomností genů IEC klastru (immune evasion cluster) a vyšší afinitou k lidským hostitelům.

Prezentovaná studie se zaměřuje na genetickou charakteristiku izolátů MRSA CC398 získaných od lidí, hospodářských zvířat a domácích mazlíčků s cílem porovnat jejich vlastnosti, identifikovat rozdíly mezi LA- a HO-MRSA a porozumění adaptace tohoto klonálního komplexu napříč hostiteli.

Metody

Vzorky od lidí, domácích mazlíčků, skotu a prasat byly získány ze soukromých klinických laboratoří, FNOL a ze Státního veterinárního ústavu. Všechny izoláty byly identifikovány jako MRSA pomocí PCR – geny *mecA/mecC* a *sa442*.

U všech izolátů byla provedena PCR potvrzující příslušnost ke CC398 a faktory virulence (*pvl*, *eta*, *etb* a *tst*). *Spa* typizace byla provedena PCR amplifikací oblasti X genu pro protein A (*spa*), produkty byly sekvenovány (externě – Eurofins Genomics, Germany) a analyzovány pomocí <https://spatyper.fortinbras.us/>.

U všech izolátů byla také testována citlivost k antibiotikům metodou diskové difuze. Použity byly disky: DA – klindamycin (2 µg), E – erytromycin (15 µg), CN – gentamicin (10 µg), TE – tetracyklin (30 µg), C – chloramfenikol (30 µg), CIP – ciprofloxacin (5 µg), FOX – cefoxitin (30 µg), RD – rifampicin (5 µg).

Výsledky a diskuze

Celkem bylo za období 2021-2025 získáno 34 izolátů od hospodářských zvířat, 37 izolátů od lidí a 15 izolátů od domácích mazlíčků, které byly podrobeny genetické analýze (tabulka 1)

U lidských izolátů byly patrné rozdíly mezi skupinou HO-MRSA a LA-MRSA. Skupina HO-MRSA vykazovala přítomnost genů *lukPV* pro Pantonův-Valentinův leukocidin, což naznačuje potenciálně vyšší virulenci. Naopak ve skupině lidských izolátů patřících k LA-MRSA nebyly tyto geny přítomny vůbec. Klonální rozmanitost byla nízká – v obou skupinách dominoval *spa* typ t034, u HO-MRSA téměř výhradně.

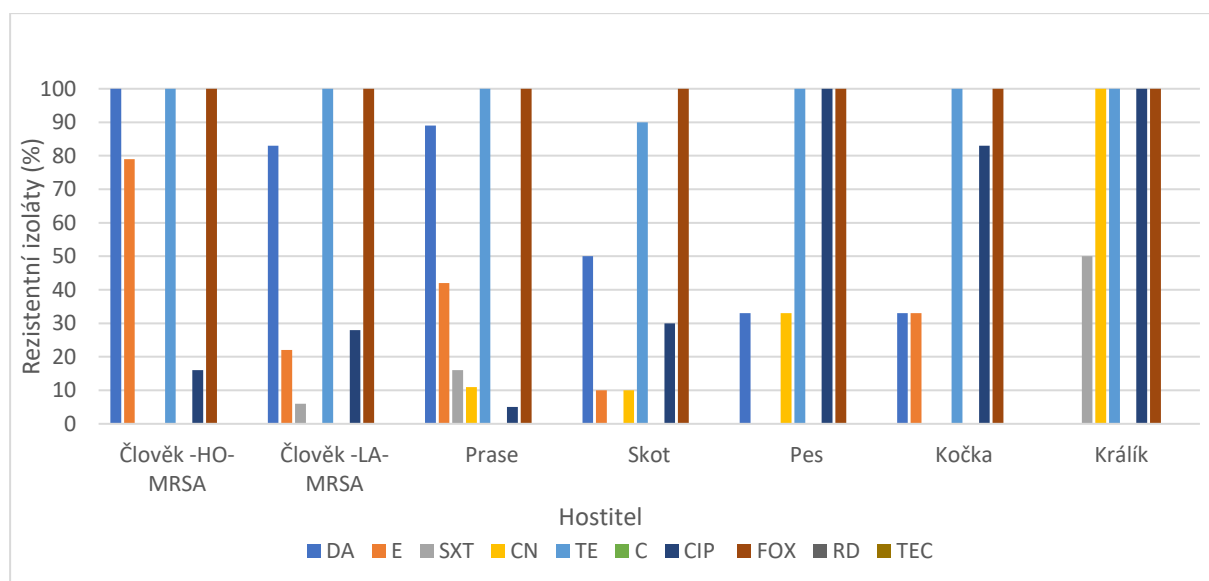
Izoláty od hospodářských zvířat (prasata, skot) postrádaly všechny testované virulenční faktory a byly charakterizovány převahou *spa* typů typických pro klonální komplex CC398, především t034 a t011. To podporuje jejich zařazení mezi typické LA-MRSA, přizpůsobené zvířecímu hostiteli.

U domácích mazlíčků byly izoláty geneticky bližší LA-MRSA než lidským komunitním izolátům – převažovaly t011 a t034, bez detekce *pvl*, *eta*, *etb* a *tst*. U králíků se jednalo výhradně o *spa* typ t011.

Tabulka 1: Přehled detekovaných genů a určených *spa* typů u jednotlivých skupin izolátů MRSA CC398

Hostitel		počet izolátů	<i>pvl</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>tst</i>	<i>spa</i> typ
Člověk	HO-MRSA	19	19 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	t034 (89,5 %), t571 (5,3 %), t6587 (5,3 %)
	LA-MRSA	18	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	t034 (55,6 %), t011 (16,7 %), t899 (11,1 %), t1255 (5,6 %), t8620 (5,6 %)
Prase	LA-MRSA	24	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	t034 (25 %), t011 (41,7 %), t1255 (4,2 %), t571 (4,2 %), t1793 (4,2 %), neurčený (20,8 %)
Skot	LA-MRSA	10	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	t034 (80 %), t011 (10 %), t4652 (10 %)
Pes	LA-MRSA	3	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	t034 (33,3 %), t011 (66,7 %)
Kočka	LA-MRSA	6	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	t011 (66,7 %), t034 (16,7 %), t4395 (16,7 %)
Králík	LA-MRSA	6	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	t011 (100 %)

Všechny izoláty napříč jednotlivými kategoriemi vykazují společnou rezistenci vůči cefoxitinu (indikátor pro MRSA) a tetracyklinu, což je charakteristický znak pro LA-MRSA. Rezistence ke klindamycinu a erytromycinu se vyskytuje ve všech skupinách, s výjimkou izolátů od králíků, které vykazují citlivost na tyto látky. U izolátů od králíků se naopak objevuje rezistence k sulfamethoxazolu/trimetoprimu a gentamicinu. Rezistence vůči ciprofloxacinu je detekována ve všech kategoriích, přičemž její prevalence je výrazně vyšší u domácích mazlíčků ve srovnání s ostatními skupinami. Tento vzorec rezistence naznačuje šíření LA-MRSA napříč různými skupinami, přičemž u králíků lze pozorovat určité rozdíly v rezistenci vůči specifickým antibiotikům.



Graf 1. Rezistence vůči antibiotickým látkám u všech kategorií izolátů CC398

Závěr

Analýza MRSA izolátů z období 2021–2025 prokázala jasné genetické odlišení humánních HO-MRSA a LA-MRSA, přičemž HO-MRSA izoláty vykazovaly přítomnost virulenčních genů, zejména *lukPV*, a téměř výhradně náležely ke *spa* typu t034. Tyto nálezy ukazují na vyšší virulenci a odlišný evoluční původ HO-MRSA jako samostatné vývojové linie. U lidí však byly současně detekovány i izoláty LA-MRSA, což potvrzuje přenos těchto kmenů ze zvířecího prostředí do humánní populace. Izoláty od hospodářských zvířat a domácích mazlíčků postrádaly testované virulenční faktory a byly charakterizovány typickými LA-MRSA *spa* typy (t034, t011), odpovídajícími klonálnímu komplexu CC398. Přestože jsou u domácích mazlíčků často popisovány komunitní kmeny MRSA, v tomto souboru byly výhradně detekovány kmeny odpovídající profilu LA-MRSA. Výsledky tak potvrzují cirkulaci LA-MRSA napříč různými hostitelskými skupinami.

Poděkování

Studie byla podpořena projektem AZV – NU23-09-00488.

Literatura je k nahlédnutí u autorky.

Kontaktní adresa: Kristýna Brodíková, Mgr., Ústav veřejného zdraví, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno; kristyna.brodikova@med.muni.cz

Vliv ochranné kultury na mikrobiologickou kvalitu dušené šunky

Effect of protective culture on the microbiological quality of cooked ham

Simona Ondruchová, Marta Dušková, Helena Veselá, Pavlína Navrátilová,
Alena Zouharová, Markéta Hušáková, František Ježek, Josef Kameník

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno

Summary

*This study evaluated the microbiological effect of the protective culture SafePro® (Novonesis) in cooked ham. Two batches were prepared from high-quality pork topside; half contained the culture, the other served as control. After heat treatment (70 °C/10 min or Fc 10), samples were stored at 3 °C for up to 3 months. Psychrotrophic microorganisms (pTVC) and lactic acid bacteria (pLAB) were monitored. The pLAB counts increased to 6.6 log CFU/g, dominated by *Pediococcus* spp., before heat treatment. After processing, all samples remained below detection limits throughout storage. The addition of the protective culture SafePro® contributed to the maintenance of the microbiological stability of cooked ham throughout the entire storage period.*

Keywords: *bioprotection; lactic acid bacteria; psychrotrophic microorganisms; thermal stability*

Úvod

Znehodnocení masa v potravinovém řetězci představuje závažný problém s ekonomickými i environmentálními dopady. Až 23 % masa končí jako odpad, především pak ve fázi spotřeby (Karwowska et al., 2021). Hlavní příčinou je mikrobiální kažení. Počáteční mikrobiální kontaminace se běžně pohybuje mezi 2–3 log KTJ/g a díky vysokému obsahu živin dochází ke zkrácení údržnosti (Cavalari et al., 2024). Jednou z účinných strategií ochrany jsou ochranné kultury, zejména bakterie mléčného kvašení (BMK), které potlačují růst nežádoucí mikrobioty kompeticí o živiny nebo produkcí antimikrobiálních látek, jako jsou organické kyseliny a bakteriociny (Danielski et al., 2020; Fan et al., 2025).

Dušená šunka je kvůli nízkému obsahu soli, hodnotě pH okolo 6,0 a vysoké aktivitě vody k mikrobiálnímu kažení obzvláště náchylná, zejména po krájení a balení. Využití ochranných kultur se v tomto typu výrobku jeví jako účinný nástroj ke zvýšení mikrobiologické stability a prodloužení údržnosti (Hu et al., 2008; Alessandria et al., 2023).

Materiál a metody

Dušené šunky byly připraveny ve dvou experimentech (únor a srpen 2024) z vepřových vrchních šálů v kategorii „nejvyšší jakosti“. Polovina každé šarže obsahovala ochrannou kulturu SafePro® (Novonesis), druhá sloužila jako kontrola. Po tumblování bylo dílo uloženo na 24 hodin při 2 °C, následně plněno do bariérových polyamidových obalů a tepelně opracováno dvěma způsoby: klasicky (70 °C/10 min; VETUNI Brno) a režimem Fc 10 (Mauting, Valtice). Celkem bylo analyzováno 116 vzorků ve dvou paralelách. Odběry probíhaly před a po tepelném opracování, po 1 a 2 týdnech, a po 2 a 3 měsících skladování při 3 °C. V experimentu 1 (po 7 týdnech) a experimentu 2 (po 6 týdnech) byla provedena termostatová zkouška (inkubace při 15 °C/7 dní).

Mikrobiologická analýza zahrnovala stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů (pCPM) a psychrotrofních BMK (pBMK). Počty pCPM byly stanoveny dle ČSN ISO 17410:2020 na GTK agar (Oxoid, UK) po 10 dnech inkubace při 6,5 °C. Počet pBMK byl stanoven na MRS agar (Oxoid, UK), při anaerobní inkubaci (15 °C, 7 dní). Kolonie byly testovány na katalázu a oxidázu. Ve druhém kole byly suspektní izoláty dále identifikovány pomocí hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF.

Výsledky a diskuze

V experimentu 1 byly počty pCPM i pBMK nižší (4,3 a 1,8 log KTJ/g) než v experimentu 2 (5,3 a 2,5 log KTJ/g), viz Tabulka 1. Statistické porovnání mezi jednotlivými fázemi (maso, nasolené dílo, po 24 h) však neprokázalo významné rozdíly ($p > 0,05$). Po 24 hodinách vzrostl počet pBMK ve vzorcích s ochrannou kulturou až na 6,6 log KTJ/g. V experimentu 2 byla ve vzorcích s ochrannou kulturou zjištěna dominance *Pediococcus* spp., zatímco v kontrolních vzorcích převažoval *Latilactobacillus sakei*, tento výsledek může souviset se složením konkrétního preparátu SafePro[®] nebo s mezidruhovou kompeticí mezi BMK.

Tabulka 1: Výsledky mikrobiologických analýz před tepelným opracováním

Ukazatel	Vzorek	Odběr (průměr počtu log KTJ/g)		
		maso	nasolené dílo	po 24 h
Experiment 1				
pCPM	Bez kultury	4,3	4,3	3,9
	S kulturou		4,3	4,4
pBMK	Bez kultury	1,8	1,8	<1,7
	S kulturou		6,8	6,6
Experiment 2				
pCPM	Bez kultury	5,3	4,8	4,6
	S kulturou		5,0	4,7
pBMK	Bez kultury	2,5	3,3 ^L	3,5 ^L
	S kulturou		6,5 ^P	6,6 ^P

L – *Latilactobacillus sakei*; P – *Pediococcus* spp.

Po tepelném opracování zůstaly hodnoty pCPM i pBMK ve všech vzorcích po celou dobu skladování pod detekčním limitem. Výjimkou byl experiment 1, kde se u vzorků bez ochranné kultury přechodně vyskytly pCPM: 1,9 log KTJ/g (2. týden) a 3,6 log KTJ/g (2. měsíc), jak je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Výsledky mikrobiologických analýz po tepelném opracování – experiment 1

Ukazatel	Vzorek	Odběr (průměr počtu log KTJ/g)					
		0. týden	Po 1 týdnu	Po 2 týdnech	Po 7 týdnech*	Po 2 měsících	Po 3 měsících
pCPM	Bez kultury	<1,0	<1,0	1,9	2,0	<1,0	<1,0
		<1,0	<1,0	<1,0	3,4	3,6	<1,0
	S kulturou	<1,0	<1,0	<1,0	2,7	<1,0	<1,0
		<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
pBMK	Bez kultury	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
		<1,7	<1,7	<1,7	2,0	<1,7	<1,7
	S kulturou	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
		<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

*termostatová zkouška (inkubace vzorku 15 °C/7 dní)

Tabulka 3: Výsledky mikrobiologických analýz po tepelném opracování – experiment 2

Ukazatel	Vzorek	Odběr (průměr počtu log KTJ/g)					
		0. týden	Po 1 týdnu	Po 2 týdnech	Po 7 týdnech*	Po 2 měsících	Po 3 měsících
pCPM	Bez kultury	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
		<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	S kulturou	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
		<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
pBMK	Bez kultury	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
		<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
	S kulturou	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7
		<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7	<1,7

*termostatová zkouška (inkubace vzorku 15 °C/7 dní)

Po termostátové zkoušce (15 °C/7 dní) se v experimentu 1 (Tabulka 2) hodnoty obou ukazatelů pohybovaly mezi 1,9–3,9 log KTJ/g, zatímco v experimentu 2 zůstaly pod detekčním limitem (viz. Tabulka 3). Výsledky potvrzují, že při správném chlazení zůstává mikrobiologická kvalita tepelně opracované dušené šunky stabilní i při delším skladování.

Závěr

Tepelné opracování se ukázalo jako klíčový krok pro zajištění mikrobiologické stability dušené šunky. I když některé mikroorganismy mohou tepelný zásah přežít, dodržení chladírenského řetězce efektivně brání jejímu pomnožení. Přídavek ochranné kultury SafePro® přispěl k udržení mikrobiologické stability dušené šunky po celou dobu skladování.

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci projektu QK23020047 (NAZV, MZe ČR).

Literatura

- ALESSANDRIA, V.; FERROCINO, I.; CARTA, V.; ZULIANI, V.; et al. Selection of food cultures with protective properties for cooked ham. *Food Microbiology*. 2023, vol. 112, art. n. 104218.
- CAVALARI, C. M. de A.; IMAZAKI, P. H.; PIRARD, B.; LEBRUN, S.; VANLEYSEN, R.; et al. *Carnobacterium maltaromaticum* as bioprotective culture against spoilage bacteria in ground meat and cooked ham. *Meat Science*. 2024, vol. 211, art. n. 109441.
- ČSN ISO 17410:2020. Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů. Praha: Česká agentura pro standardizaci, 2020.
- DANIELSKI, G. M.; IMAZAKI, P. H.; et al. *Carnobacterium maltaromaticum* as bioprotective culture in vitro and in cooked ham. *Meat Science*. 2020, vol. 162, art. n. 108035.
- FAN, Y.; ZHANG, K.; LIU, Q.; CHEN, Q.; XIA, X.; et al. Mechanism, application, and prospect of bioprotective cultures in meat and meat products. *Food Chemistry*. 2025, vol. 476, art. n. 143474.
- HU, P.; XU, X. L.; ZHOU, G. H.; HAN, Y. Q.; XU, B. C.; LIU, J. C. Study of the *Lactobacillus sakei* protective effect towards spoilage bacteria in vacuum packed cooked ham analyzed by PCR–DGGE. *Meat Science*. 2008, vol. 80, p. 462–469.
- KARWOWSKA, M.; ŁABA, S.; SZCZEPAŃSKI, K. Food loss and waste in meat sector - Why the consumption stage generates the most losses? *Sustainability*. 2021, vol. 13, art. n. 6227.

Kontaktní adresa: Simona Ondruchová, Ing., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, ondruchovas@vfu.cz

Dynamic changes in the plasmidome and resistome in the gastrointestinal tract of chickens

^{1,2,3}Marketa Rysava, ^{2,3}Jana Palkovicova, ^{4,5,6}Jana Schwarzerova, ⁴Darina Cejkova,
^{1,2}Katarina Stredanska, ⁴Marketa Jakubickova, ⁷Derya Aytan-Aktug, ⁷Saria Otani,
^{1,2,3,8,9}Monika Dolejska

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

³Department of Microbiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

⁴Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Czech Republic

⁵Molecular Systems Biology (MOSYS), Department of Functional and Evolutionary Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Vienna, Austria

⁶Department of Molecular and Clinical Pathology and Medical Genetics, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

⁷Research group for Genomic Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark

⁸Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of AgriSciences, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic

⁹Division of Clinical Microbiology and Immunology, Department of Laboratory Medicine, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

Summary

The emergence and dissemination of antibiotic resistance genes in animal microbiomes represent a growing public health concern. This study investigates the temporal dynamics of the plasmidome and resistome in broiler chickens under antibiotic treatment. Long-read and short-read sequencing approaches revealed the diversity and mobility of antibiotic resistance genes and their association with specific plasmid types. The data showed that fluoroquinolone resistance genes were increasingly mobilized via MOB_P-type plasmids over time, while other resistance types exhibited more stable patterns. Despite technical limitations, plasmidome analysis provided critical insights into the mechanisms driving the spread of antibiotic resistance genes, highlighting its importance for monitoring antimicrobial resistance in agricultural environments.

Keywords: plasmidome; resistome; antibiotic resistance genes; horizontal gene transfer; broiler chickens

Introduction

The expansion of intensive poultry farming has accelerated the use of antibiotics, which has contributed to the growth of antibiotic-resistant bacteria. Although regulatory measures in the European Union restrict the use of antibiotics, poultry farming continues to contribute to the high consumption of antibiotics [1]. The gut microbiome of chickens, although beneficial for host health, serves as a reservoir for antibiotic resistance genes (ARGs) that are potentially transmissible to other bacteria, including pathogens, through horizontal gene transfer (HGT) [2]. Plasmids play a key role in this transfer. However, studies specifically focusing on the total plasmid content (plasmidome) in the chicken gut are still scarce [3].

Materials and methods

Fecal samples were collected from Ross 308 broiler chickens housed in three separate houses on a commercial farm in South Moravia, Czechia. Chickens received enrofloxacin early in life, with additional sulfamethoxazole/trimethoprim treatment in one house. Plasmid DNA was extracted from chicken droppings using modified protocols combining Mini and Midi plasmid extraction kits (Qiagen, GE). Samples were treated with Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase

(Biosearch Technologies, UK) to eliminate chromosomal DNA and then amplified using phi29 polymerase (Biosearch Technologies, UK). Long-read sequencing libraries were prepared with Oxford Nanopore Technologies kits and sequenced on a P2Solo platform. In parallel, short-read metagenomic libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq X system. Data was processed using adapter trimming (Porechop), quality filtering and length filtering (BBduk from BBmap package), and quality control (FastQC). Assemblies were performed using Flye with post-assembly polishing by Racon. ARGs and mobile genetic elements (MGEs) were identified using KMA and annotated with ABRicate. Plasmid typing was conducted with the MOB-suite pipeline. Taxonomic profiling of metagenomic data was performed using MetaPhlAn. Gene co-occurrence networks were generated by custom Python scripts and visualized with Cytoscape, while data visualization was performed using Matplotlib.

Results

Plasmidome analysis of the collected chicken fecal samples revealed a high diversity of plasmid types and associated ARGs. A total of 133 different plasmid types were detected in the plasmidome, while only 59 were found in the metagenome. Resistance genes associated with 26 different antibiotic classes were identified. Network-based co-occurrence analysis revealed strong associations between specific plasmids and ARGs, most notably the link between fluoroquinolone resistance genes and plasmids from the MOBP group (Fig. 1). Temporal analysis showed a progressive increase in fluoroquinolone resistance genes, particularly linked to small MOBP-type plasmids. In contrast, resistance to diaminopyrimidines remained relatively stable throughout the sampling period. Long-read sequencing enabled the reconstruction of five complete plasmids carrying ARGs, ranging in size from 2.6 kb to 47.6 kb. Most ARGs in the chicken gut microbiome were found on small plasmids, possibly due to the higher degradation of large plasmids during extraction, greater copy numbers of small plasmids, phi29 amplification bias, or microbiome composition. The most occurring plasmid across the samples was a 3 kb long MOBP-like plasmid of rep_cluster_2335 containing *qnrB46-like*|pan_9298 gene.

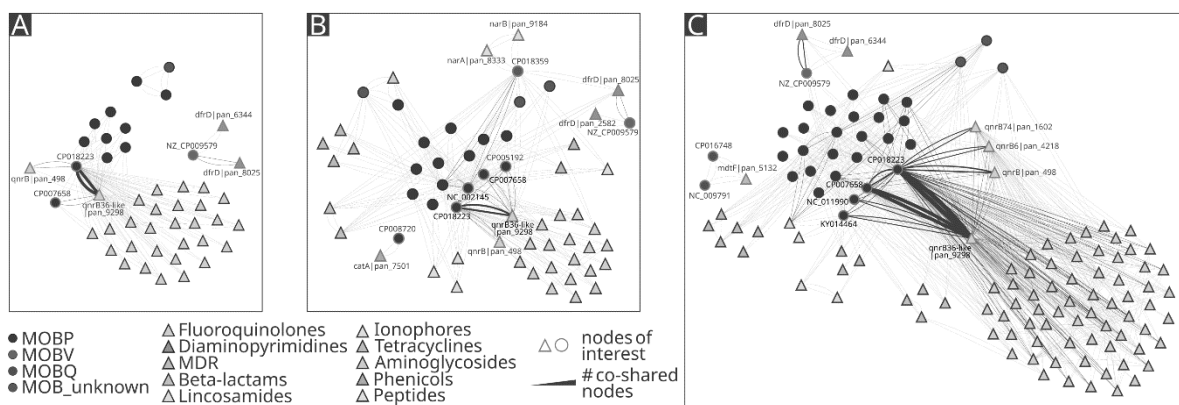


Figure 1: Co-occurrence network of antibiotic resistance genes and plasmids in different houses.

The undirected network, where nodes represent plasmids (circles) or antibiotic resistance genes (triangles), and edges represent their co-occurrence on the same sequence. The width of the edges corresponds to the number of sequences co-sharing the specific nodes ranging from one read to 20,712 reads. Layout does not represent similarity or spatial distance as node positions were manually adjusted for an improved visual clarity.

Discussion

Our study demonstrated a progressive increase in the mobilization of fluoroquinolone resistance genes associated with MOBP-type plasmids in the chicken gut microbiome. This finding is consistent with previous reports showing that fluoroquinolone usage in poultry strongly selects for plasmid-mediated resistance [4]. Despite the use of trimethoprim-containing treatment in the second chicken house, no substantial increase in *df*r gene prevalence or diversity of plasmid associations was observed. This suggests that the treatment-induced selective pressure did not result in detectable mobilization or expansion of diaminopyrimidine resistance genes within the sampling period, which contrasts with previous studies reporting increased *df*r gene prevalence following similar treatment in pigs [5]. The plasmidome analysis provided deeper insights compared to metagenomics, emphasizing the critical role of small plasmids in ARG dissemination. Limitations, such as preferential amplification of small plasmids and potential degradation of large plasmids during DNA processing, should be considered when interpreting the data.

Conclusion

Insights into resistance evolution and dissemination require approaches capable of identifying both chromosomal and mobile genetic elements. Detailed plasmidome analysis revealed specific signatures of fluoroquinolone resistance gene dissemination that were not captured by metagenomic analysis alone. Although technical limitations exist, integrating plasmidome and metagenomic strategies provides a clearer understanding of horizontal gene transfer risks in complex microbial ecosystems.

This study was financially supported by the IGA VETUNI 208/2024/FVHE project and the Czech Science Foundation (22-16786S).

References

- [1] SIMJEE, S.; IPPOLITO, G. European regulations on prevention use of antimicrobials from January 2022. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*. 2022, vol. 44.
- [2] BŁAŻEJEWSKA, A.; ZALEWSKA, M.; GRUDNIAK, A.; POPOWSKA, M. A comprehensive study of the microbiome, resistome, and physical and chemical characteristics of chicken waste from intensive farms. *Biomolecules*. 2022, vol. 12, no. 8.
- [3] KIRSTAHLER, P.; et al. A peek into the plasmidome of global sewage. *mSystems*. 2021, vol. 6. DOI: 10.1128/msystems.00283-21.
- [4] DELSOL, A.A.; SUNDERLAND, J.; WOODWARD, M.J.; PUMBWE, L.; PIDDOCK, L.J.; ROE, J.M. Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, vol. 53, no. 5, s. 872–874.
- [5] MAZUREK, J.; BOK, E.; STOSIK, M.; BALDY-CHUDZIK, K. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from pigs during metaphylactic trimethoprim and sulfamethoxazole treatment and in the post-exposure period. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015, vol. 12, no. 2, s. 2150–2163.

Contact address: Markéta Ryšavá, Ing., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22339@vfu.cz

SEKCE 2

**Chov zvířat, výživa zvířat
a biochemie**

Vliv rizikových faktorů na výskyt equinního astmatu

Impact of risk factors on the development of equine asthma syndrome

¹Vondráčková Tereza, ¹Jahn Petr, ^{2,3}Jánová Eva

¹Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

²Ceitec VETUNI, Brno, Czech Republic

³Ústav genetiky, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Summary

Equine asthma syndrome (EAS) is a commonly diagnosed respiratory disorder in horses, likely influenced by a multifactorial etiopathogenesis involving environmental and management-related risk factors. This retrospective study evaluated the seasonality of 531 clinic visits by horses affected by EAS at the VETUNI Equine Clinic over a 10-year period. Monthly visit data were standardised to 30-day months. Statistical analysis revealed a significant variation in case distribution throughout the year ($\chi^2 = 17.178$; $p < 0.001$), with a higher frequency of visits observed during the warmer months compared to the colder season. A comparison with the average monthly precipitation levels in the Czech Republic suggested a potential link between increased rainfall and a rise in EAS cases, indicating that environmental moisture may contribute to the seasonal occurrence of the disease.

Key words: equine asthma syndrome; risk factors; seasonality

Úvod

Syndrom equinního astmatu (EAS) je onemocnění vyskytující se v celosvětové populaci koní s vysokou prevalencí (Ivester et al., 2018). Současná věda předpokládá, že etiopatogeneze EAS je multifaktoriální problém a velmi důležitý podíl v něm má genetická predispozice a environmentální faktory spojené s podmínkami a managementem chovu (Couetil et al., 2020). Mezi hlavní prokázané rizikové faktory vzniku EAS patří inhalace různých typů aeroalergenů, které v dolních cestách dýchacích vyvolávají neinfekční zánětlivou odpověď (Couetil et al., 2016). U ustájených koní bývá v tomto kontextu nejčastěji zmiňován organický prach a mikroskopické části plísni, pocházející zejména ze sena a podestýlky (Ivester et al., 2018). Naproti tomu u koní chovaných na pastvinách se jako významné faktory podílející se na rozvoji EAS uplatňují travní pyly a plísně (Dauvillier et al. 2019). Tyto rozdíly mohou částečně vysvětlovat sezónní charakter četnosti onemocnění, kdy epizody exacerbace korelují s obdobími zvýšené koncentrace konkrétních alergenů v dechové zóně koně. V poslední době se zkoumá také možný vliv virových infekcí, složení respiračního mikrobiomu a mykobiomu na rozvoj EAS, což nadále podporuje hypotézu multifaktoriální etiologie (Couetil et al., 2020).

Cílem této studie bylo retrospektivní posouzení sezónnosti výskytu EAS u koní, kteří byli v letech 2011-2020 přijati na KCHK VETUNI. Získaná data byla následně porovnána s dostupnými meteorologickými údaji o srážkách na území České republiky.

Materiál a metody

Prostřednictvím archivovaných chorobopisů a databáze VETIS bylo zjištěno, že na KCHK VETUNI Brno bylo mezi lety 2011–2020 zaevidováno 531 návštěv koní s EAS. Zařazení pacientů do sledovaného souboru probíhalo při splnění minimálních kritérií, mezi něž patřila evidence koně v databázi kliniky v uvedeném časovém období, známé národně (věk, pohlaví, plemeno) a anamnéza či klinické vyšetření svědčící o chronickém zánětu dolních cest dýchacích dle zrevidovaného konsenzu ACVIM (Couetil et al., 2016). Získané informace byly zpracovány do přehledové tabulky znázorňující sezónní rozvrstvení návštěv nemocných koní.

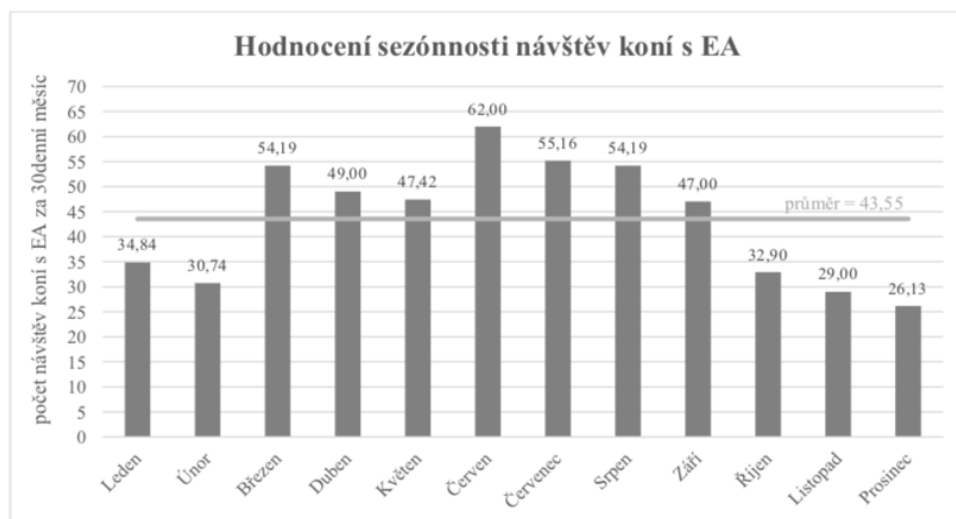
V rámci studie byl zjišťován vliv sezónnosti na příjem pacientů s diagnózou EAS na kliniku v daném časovém období. Pro účely statistické analýzy byl spočítán celkový počet návštěv za jednotlivé měsíce v každém roce a následně byly tyto hodnoty pro dané měsíce sečteny napříč všemi roky sledovaného období. Tímto způsobem byl získán celkový počet návštěv v konkrétních měsících za období 10 let. Za účelem eliminace vlivu rozdílné délky jednotlivých měsíců, byly tyto hodnoty přepočteny tak, jako by každý měsíc měl 30 dní. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí χ^2 testu.

Údaje o počtech návštěv koní s EAS v jednotlivých letech a měsících byly pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (R_s) statisticky porovnány v programu *Statistica for Windows* s informacemi o průměrném měsíčním množství srážek na území České republiky. Meteorologická data byla získána z archivu Českého hydrometeorologického ústavu (ČHMÚ).

Výsledky a diskuse

Vliv sezónnosti na počet návštěv na KCHK VETUNI

Statistickou analýzou celkového počtu návštěv ($n=531$) byla zjištěna průměrná hodnota návštěv pacientů s EAS ($n=43,55$) za jeden 30denní měsíc. Vzájemným srovnáním jednotlivých měsíčních úhrnů návštěv bylo dokázáno, že období březen-září vykazovalo nadprůměrné hodnoty, zatímco říjen-únor hodnoty podprůměrné (Graf 1). Porovnáním celkového počtu návštěv za tyto dvě období bylo dokázáno, že existuje statisticky významný rozdíl ($\chi^2=17,178$; $p<0.001$) v rozložení návštěv mezi teplejším a chladnějším obdobím roku, kdy během jara a léta byl počet návštěv koní s EAS výrazně vyšší než na podzim a v zimě. Toto může souviset s přítomností určitých aeroalergenů (travní pyly a plísňe) v prostředí a vysoký peak návštěv během letních měsíců by tedy teoreticky mohl poukazovat na zvýšený výskyt EAS asociovaného s pastvou (Costa et al., 2006; Couetil et al., 2020). Hypotéza, že v rámci chladnějšího období roku, kdy jsou koně často ustájeni nebo přikrmováni z balíků sena ve výběhu, bude pozorován nárůst případů kvůli větší koncentraci prachu a aeroalergenů v respirační zóně koně (Bond et al., 2018; Couetil et al., 2020), se v naší studii nepotvrdil.



Graf 1: Hodnocení sezónnosti návštěv koní s EA za jednotlivé měsíce v letech 2011-2020.

Vliv průměrných srážek na počet návštěv koní s EA na KCHK VETUNI

Dalším zkoumaným parametrem byla souvislost mezi počtem návštěv astmatických koní na kliniku a zvýšeným množstvím srážek na území ČR v daný měsíc. Když byl celkový počet návštěv v jednotlivých měsících porovnán s průměrným měsíčním úhrnem srážek, výsledky ukázaly, že s rostoucím množstvím srážek v daném měsíci narůstá i počet návštěv koní s EAS.

(RS1 = 0,591; $p = 0,043$). Stejně závěry přinesla i analýza pro každý měsíc v jednotlivém roce zvlášť (RS2 = 0,219; $p = 0,016$). Na základě našich výsledků i závěrů studií prováděných v jihovýchodní oblasti USA (Costa et al., 2006) u koní trpících závažným EAS asociovaným s pastvou, lze vyslovit opatrnou hypotézu, že by rozvoj astmatu mohl být obecně spojen se zvýšeným množstvím srážek a s tím i souvisejícím nárůstem aeroalergenů (pyly a plísňe). Na druhou stranu výzkum závažného pastvou asociovaného astmatu, který byl uskutečněn na území UK, se s naší a americkou studií neshoduje, protože uvádí období výskytu onemocnění zejména v kontextu suchých a horkých letních dní (Couetil et al., 2020).

Závěr

Při interpretaci výsledků naší studie je zapotřebí zohlednit i několik omezení, které mohly vést k distinkcím mezi realitou a analyzovanými daty. Jedno z úskalí výzkumu je, že zařazení pacientů do jednotlivých měsíců neodráží přesné datum přijetí na kliniku, což prakticky může zkreslovat vyhodnocení sezónnosti v závislosti na úhrnu srážek v daném měsíci na území ČR. Další nepřesnosti představuje fakt, že údaje o srážkách byly posuzovány v celorepublikovém měřítku, a nikoliv podle konkrétní lokality ustájení koní. Určité zkreslení může přinést i skutečnost, že pacienti s EAS byli pro účely výzkumu sumarizováni do jedné skupiny, bez ohledu na fenotyp onemocnění a informace o managementu jejich chovu.

Závěrem lze tedy říci, že syndrom equinního astmatu spolu se všemi jeho fenotypy je komplexní onemocnění, jehož vznik může ovlivnit řada různých faktorů. Je tak zapotřebí etiopatogenezi EAS posuzovat v širších souvislostech a pro její lepší pochopení jsou nezbytné další prospektivní epidemiologické studie, které detailněji zohlední i informace o způsobu chovu, managementu životního prostředí a krmení astmatických koní společně v kontextu sezónnosti a meteorologických podmínek v různých geografických lokalitách v daném čase.

Literatura

- BOND, S., LÉGUILLLETTE, R., RICHARD, E. A., COUETIL, L. L., LAVOIE, J.-P., MARTIN, J. G. a PIRIE, R. S. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2018. 32(6): 2088-2098.
- COSTA, L.R., JOHNSON, J. R., BAUR, M. E., a BEADLE, R. E. Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses. *American journal of veterinary research*. 2006. 67(9): 1635-1642.
- COUETIL, L.L., CARDWELL, J. M., GERBER, V., LAVOIE, J.-P., LEGUILLETTE, R. a RICHARD, E. A. Inflammatory airway disease of horses—revised consensus statement. *Journal of veterinary internal medicine*. 2016. 30(2): 503-515.
- COUETIL, L.L., CARDWELL, J.M., LEGUILLETTE, R., MAZAN, M., RICHARD, E., BIENZLE, D., BULLONE, M., GERBER, V., IVESTER, K., LAVOIE, J.-P., MARTIN, J., MORAN, G., NIEDZWIEDZ, A., PUSTERLA, N. a SWIDERSKI, C. Equine asthma: Current understanding and future directions. *Frontiers in veterinary science*. 2020. 7: 1-21.
- DAUVILLIER, J., TER WOOD, F. a VAN ERCK-WESTERGREN, E. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *Journal of veterinary internal medicine*. 2019. 33(2): 968-975.
- IVESTER, K.M., COUETIL, L.L. a MOORE, G.E. An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *Journal of veterinary internal medicine*. 2018. 32(5): 1754-1762.

Kontaktní adresa

Tereza Vondráčková, MVDr., Klinika chorob koní, FVL VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, vondrackovat@vfu.cz

Vliv diet obohacených o alternativní komponenty na vybrané ukazatele jatečné hodnoty u brojlerových králíků

Effect of diets enriched with alternative components on selected parameters of carcass traits in fattening rabbits

Poláková Klára, Šimek Vlastimil, Dobšíková Radka

Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie
Veterinární univerzita Brno, Česká republika

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation with alternative plant components on selected parameters of growth and carcass traits in fattening rabbits. The rabbits were fed four types of diets for a period of 45 days. For this observation, a control complete diet was created, as well as three diets enriched with alternative herbal components: a complete diet enriched with 2.5% dried artichoke leaves (*Cynara scolymus*), a complete diet enriched with 2.5% dried *Spirulina platensis* and *Chlorella* spp. mixture and a complete diet enriched with 2.5% of 5 herbs at 0.5% each (*Thymus vulgaris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Rosa canina*, *Mentha piperita*, *Foeniculum vulgare*) mixture. At the end of the observation, it was found that the highest carcass yield was achieved in the group fed the diet enriched with a mixture of 5 herbs (54%). Furthermore, the group receiving the diet enriched with a mixture of herbs showed significantly highest thigh weight (482 g), compared to the group fed the artichoke enriched diet (-98 g, $P < 0.05$).

Keywords: alternative diets; carcass; fattening rabbits; herbs; algae

Úvod

V současné době se v rámci krmivářské praxe klade důraz na dietární využití doplňkových látek v krmivech, které mohou mít pozitivní vliv na funkci gastrointestinálního traktu a střevní mikroflóru králíků (Placha et al., 2022). Ve výkrmu brojlerových králíků se standardně využívají základní krmné diety, které splňují pouze základní živinové požadavky, a použití obohacených krmných diet není pro tuto kategorii králíků běžnou praxí. V posledních letech se zvýšil trend v použití řas rodu *Chlorella* a sinic rodu *Spirulina* v krmivech a také v krmných doplňcích pro zájmová, ale i hospodářská zvířata. *Chlorella* se vyznačuje vysokým obsahem bílkovin a její přídavek v krmivech má pozitivní dopad na růst i užitkovost zvířat, dále je cenným zdrojem antioxidantů a provitaminů, které stimulují imunitní systém (Basuini et al., 2023). *Spirulina platensis* podobně jako *Chlorella* obsahuje vysoké množství proteinů a má pozitivní vliv na imunitní systém, složení střevní mikroflóry i kvalitu masa (Irshad et al., 2024). Za důležitou živinu je ve výživě králíků považován inulin. Jedná se o přírodní prebiotikum, které je fermentováno ve slepém střevě a má pozitivní vliv na fyziologii trávení u králíků. Za vhodný zdroj inulinu lze označit listy artyčoku (*Cynara scolymus*). Králík je z hlediska příjmu potravy považován za selektivní zvíře, pro které je důležitý zejména čich a také aroma přijímané potravy. Pro zvýšení atraktivity kompletních krmných směsí jsou součástí jejich receptury také aromatické druhy bylin jako např. tymián obecný (*Thymus vulgaris*). Jeho hlavní účinky jsou antimikrobiální, antioxidační a imunostimulační. Několik studií zaměřujících se na zdraví drůbeže potvrdilo příznivé účinky obdobných fyto-genických aditiv na růst, zdraví gastrointestinálního traktu a lepší jatečnou výtěžnost (Ashour et al., 2020, Zapletal et al., 2025). Cílem naší práce bylo ověřit hypotézu, že navržené obohacené diety mají pozitivní dopad na růstové charakteristiky mladých brojlerových králíků.

Materiál a metody

Odstavení mladí králíci ($n=40$) hybridní kombinace HYLA byli ve věku 35 dní rozděleni do čtyř dietárních skupin. V průběhu výkrmu byly králíkům zkrmovány čtyři typy kompletních krmných směsí – základní dieta (K; $n=10$), dieta obohacená o 2,5 % sušeného listu artyčoku (A; $n=10$), dieta obohacená o směs pěti sušených bylin (*Thymus vulgaris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Rosa canina*, *Mentha piperta*, *Foeniculum vulgare*) v dílčím zastoupení 0,5 % (SB; $n=10$) a dieta obohacená o přídavek 1,25 % prášku spiruliny a 1,25 % prášku chlorelly (SCh; $n=10$). Dietární pokusné sledování bylo realizováno za standardizovaných podmínek v soukromém konvenčním chovu králíků. Po individuálním zvážení všech 40 jedinců byly jednotlivé dietární skupiny vytvořeny tak, aby byli králíci ve skupinách hmotnostně vyrovnáni. Králíci byli ustájeni v klecích po dvojicích. Diety byly zkrmovány od 35. až do 80. dne věku. V průběhu sledování probíhalo individuální vážení králíků, a to v pravidelném intervalu jedenkrát týdně, dále byla sledována spotřeba konkrétní kompletní krmné směsi. Tato data byla následně využita pro výpočet konverze krmiva. Během celé doby sledování probíhala také pravidelná kontrola celkového zdravotního stavu králíků. Ve věku 80 dní byli všichni sledovaní králíci zváženi a následně poráženi a jatečně zpracováni. Dle metodiky Blasca a Ouhayouna (1993) byla odstraněna kůže, pohlavní orgány, močový měchýř, trávicí trakt a distální části končetin. Jatečně upravená těla (JUT) bez plic, srdce, brzlíku, průdušnice, jícnu, jater, ledvin a peritoneálního tuku, ale včetně hlav, byla zvážena do 30 minut po porážce. Dále byla JUT rozdělena na přední (od 1. krčního obratle po 7. hrudní obratel) a střední část (od 7. hrudního obratle po 6. bederní obratel) a stehna (od 6. bederního obratle, včetně os coxae a posteriorní části *m. iliopsoas*).

Získaná data byla následně statisticky vyhodnocena pomocí softwaru Statistica CZ v10.

Výsledky

Průměrné hodnoty porážkové hmotnosti brojlerových králíků včetně ukazatelů jatečných charakteristik v jednotlivých dietárních skupinách jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Průměrné hodnoty porážkové hmotnosti (g) včetně ukazatelů jatečných charakteristik ve sledovaných dietárních skupinách (průměr $\pm$ SEM).

Ukazatel	K	A	SB	SCh
Porážková hmotnost (g)	2594,0 $\pm$ 152,79	2459,0 $\pm$ 39,16	2624,0 $\pm$ 137,24	2622,0 $\pm$ 64,49
JUT (g)	1399,6 $\pm$ 88,36	1294,4 $\pm$ 21,81	1419,6 $\pm$ 91,63	1408,4 $\pm$ 65,21
Kůže (g)	464,0 $\pm$ 28,07	466,0 $\pm$ 40,46	464,0 $\pm$ 39,72	490,0 $\pm$ 26,88
Přední část (g)	386,2 $\pm$ 30,37	360,4 $\pm$ 12,10	426,2 $\pm$ 28,39	406,0 $\pm$ 22,16
Střední část (g)	294,8 $\pm$ 25,11	297,6 $\pm$ 18,15	299,6 $\pm$ 19,69	298,6 $\pm$ 16,98
Stehna (g)	410,0 $\pm$ 26,65 ^{a,b}	384,0 $\pm$ 5,10 ^a	482,0 $\pm$ 48,41 ^b	411,0 $\pm$ 16,53 ^{a,b}
Jatečná výtěžnost (%)	53,9 $\pm$ 0,00	52,7 $\pm$ 0,01	54,0 $\pm$ 0,01	53,6 $\pm$ 0,01

Pozn.: K, kontrolní skupina; A, 2,5% přídavek sušeného listu artyčoku; SB, přídavek bylin v dílčím zastoupení po 0,5 %; SCh, 1,25% přídavek spiruliny a 1,25% přídavek chlorelly; JUT, jatečně upravené tělo; ^{a,b} průměry s odlišnými indexy se průkazně liší ($P < 0,05$)

Na základě výsledků sledování lze konstatovat, že nejnižší průměrná porážková hmotnost byla zjištěna u skupiny A (2459 g). Naopak nejvyšší průměrná porážková hmotnost byla zaznamenána u skupiny SB (2624 g). Nejvyšší jatečné výtěžnosti dosáhla skupina SB (54 %). Dále u skupiny SB byla zjištěna průkazně nejvyšší hmotnost stehen (482 g), oproti skupině A (-98 g, $P < 0,05$). V porovnání skupiny SB s kontrolní skupinou však nebyl pozorován signifikantní rozdíl. Skupina SB dále dosáhla nejvyšších průměrných hodnot týkající se hmotnosti JUT (1419,6 g), hmotnosti přední (426,2 g) i střední části (299,6 g) JUT.

Diskuze

V rámci porovnání výsledků získaných v tomto sledování mezi kontrolní skupinou a skupinami pokusnými nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl. Nicméně v rámci pokusných skupin byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v hmotnosti stehen mezi skupinou SB (482 g) a skupinou A (-98 g, $P < 0,05$). Dále vzhledem k těmto předběžným výsledkům lze konstatovat, že se jako vhodná alternativní fytogenní suplementace jeví směs pěti bylin, jelikož v této skupině byla zaznamenána nejvyšší průměrná porážková hmotnost, nejvyšší hmotnost jatečně upraveného těla a nejvyšší hmotnost stehen, která jsou považována za jednu z nejhodnotnějších částí jatečně upraveného těla. Naopak námi sestavená dieta obohacená o artyčok se jeví jako spíše méně vhodná alternativní dieta pro výkrm brojlerových králíků, a to z toho důvodu, že králíci v této skupině dosáhli nejnižší průměrné porážkové hmotnosti. Jak v rámci jatečného rozboru, tak také jatečnou výtěžností tato dietární skupina (A) dosáhla nejnižších hodnot v porovnání s ostatními dietárními skupinami. Ačkoliv se z dostupných studií artyčok uvádí jako vhodný zdroj inulinu (prebiotikum), který by měl mít pozitivní dopad na trávení, v rámci našeho sledování se tento předpoklad nepotvrdil.

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že výše zvolené alternativní rostlinné komponenty negativně neovlivnily růst u sledovaných mladých brojlerových králíků, a tak je lze bezpečně zařadit do krmných diet. Přídavek směsi pěti bylin (tj. skupina SB) se projevil v nejvyšší hmotnosti stehen (482 g). Pro jejich využití v krmivářské praxi bude nezbytné provést další upřesňující sledování s ohledem na důkladnější posouzení vlivu těchto přírodních komponent na další ukazatele vnitřního prostředí a zdraví králíků.

Literatura

- ASHOUR, E. A., ABD EL-HACK, M. E., SWELUM, A. A., OSMAN, A. O., TAHA, A. E., ALHIMAIDI, A. R., & ISMAIL, I. E. Does the dietary graded levels of herbal mixture powder impact growth, carcass traits, blood indices and meat quality of the broilers? *Italian Journal of Animal Science*, 2020, 19(1), 1228–1237.
- BLASCO, A., OUHAYOUN J., Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Science*. 1993, 4:93–99.
- EL BASUINI, M.F., KHATTAB, A.A.A., HAFSA, S.H.A. et al. Impacts of algae supplements (Arthrospira & Chlorella) on growth, nutrient variables, intestinal efficacy, and antioxidants in New Zealand white rabbits. *Scientific Reports*, 2023, 13, 7891.
- IRSHAD, Z., QASIM, M., HAJATI, H., HOSSEINI, S. A. Functional feed for broiler chickens: exploring Spirulina platensis as a nutritional supplement. *World's Poultry Science Journal*, 2024, 80 (2), 511–525.
- PLACHA, I.; POGÁNY SIMONOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A. Natural Feed Additives and Novel Approaches for Healthy Rabbit Breeding. *Animals*, 2022, 12, 2111.
- ZAPLETAL, D., DOBŠÍKOVÁ, R., KOSTUKOVÁ, M., ŠIMEK, V., ROZSYPALOVÁ, L., KAMENÍK, J., JEŽEK, F. Effect of wormwood (Artemisia absinthium L.) supplementation to diet on performance, body composition, immune organs, gut morphology, amino acid composition and sensory attributes of breast meat in Eimeria-challenged chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 2025, 24(1), 1015–1027.

Kontaktní adresa: Klára Poláková, MVDr., Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, polakovak@vfu.cz

SEKCE 3

Ochrana zvířat, welfare a etologie

Výskyt a rozložení bisfenolu A v konzervovaném krmivu pro psy

Occurrence and distribution of bisphenol A in canned dog food

Konečná Nad'a, Kovaříková Simona, Maršálek Petr, Malá Veronika, Štěpánková Karla

*Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno, Česká republika*

Summary

Bisphenol A (BPA) is a widespread environmental contaminant primarily used in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics, including food packaging. As a known endocrine disruptor, BPA can migrate from packaging into food, posing potential health risks. This study aimed to assess BPA concentrations in canned dog food, compare its distribution across different layers, and evaluate migration from the internal coating of the can. The pH of the content and individual layers was monitored as a potential influencing factor. The results confirmed the presence of BPA in all examined canned food samples and in the leachates from the cans. BPA levels were notably higher in the inner layers of the food compared to the outer layers, suggesting that BPA tends to accumulate more in the inner parts of the food. A statistically significant correlation was found between BPA concentration and pH of the content in the inner layer. The pH was found to influence BPA distribution within the food. These findings highlight the potential health risks posed by BPA contamination in pet food, underlining the importance of monitoring and regulating its presence in food products.

Keywords: BPA; contaminants; canned pet food

Úvod

Díky své pevnosti a odolnosti se bisfenol A (BPA) používá při výrobě epoxidových pryskyřic a polykarbonátových plastů, ty se dále využívají například k výrobě plastových lahví, obalových materiálů nebo výplní konzerv (Rubin et al. 2011). Jako hlavní zdroj kontaminace touto látkou u lidí i zvířat je považována kontaminovaná voda a potraviny, přičemž gastrointestinální trakt je největším místem absorpce (Fu and Kawamura, 2010; Geens et al., 2012). Měřitelné koncentrace BPA byly zjištěny v konzervách rostlinného a živočišného původu určených k lidské spotřebě, ale také v konzervovaných krmivech pro zvířata (Braunrath et al., 2005; Maršálek et al., 2022). Bisfenol A je konkrétně obsažen ve vnitřní ochranné výstelce plechovky, která je vyrobena z epoxidové pryskyřice. Tento povlak zabraňuje přímému kontaktu potraviny s kovem, aby nedocházelo ke korozi, a zároveň prodlužuje trvanlivost potraviny (Dhuey et al., 2022).

Cílem této práce bylo posoudit koncentraci BPA v konzervovaných krmivech pro psy uváděných na trh v České republice, porovnat obsah BPA v různých vrstvách krmiva a zhodnotit možnost migrace BPA z vnitřní výstelky konzervy do jejího obsahu.

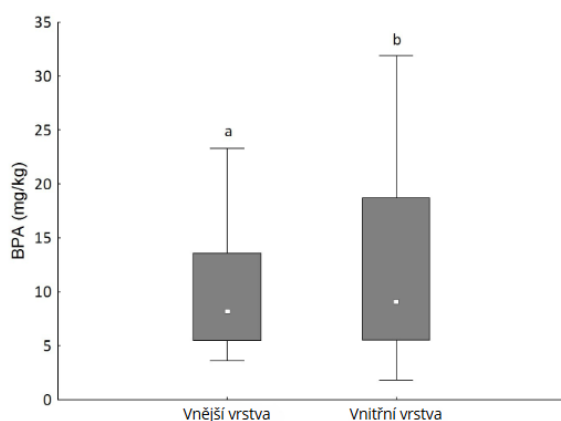
Materiál a metody

Celkem bylo analyzováno 30 konzervovaných krmiv pro psy zakoupených v běžné maloobchodní síti v ČR. Konzervy o hmotnosti 800 g pocházely od různých výrobců a obsahovaly různé příchutě i zdroje bílkovin. Vzorky byly uchovávány při pokojové teplotě a analyzovány před datem minimální trvanlivosti. Po otevření byla každá konzerva rozdělena na vnější a vnitřní vrstvu pomocí válce z tvrdého papíru (Ø 6,7 cm), který rozdělil objem konzervy na poloviny. Papír byl testován na přítomnost BPA, každý válec byl jednorázový. Obsah jednotlivých vrstev byl homogenizován ve skleněných nádobách dřevěnou stěrkou. Z každé vrstvy byl odebrán vzorek (0,5 g; vzorky A a B), poté byly vrstvy sloučeny a odebrán další vzorek (C). Hodnota pH byla měřena v obou vrstvách pomocí přístroje Testo 205. Prázdné konzervy byly omyty, naplněny 44 ml methanolu a po 24 h při pokojové teplotě pod hliníkovou

fólií byly odebrány dva vzorky (0,5 ml; vzorek D). Stanovení BPA bylo provedeno metodou kapalinové chromatografie s atmosférickou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Vzorky A–C byly extrahovány acetonitrem a derivatizovány dansylchloridem. BPA ve vzorcích methanolového výluhu (D) byl po odpaření do sucha dále derivatizován a analyzován stejným postupem dle dříve publikovaných metod (Kovaříková et al., 2021; Maršálek et al., 2022). Statistická analýza byla provedena v programu Statistica 8.0.

Výsledky a diskuze

Ve všech analyzovaných vzorcích konzervovaného krmiva pro psy byla zjištěna měřitelná koncentrace bisfenolu A (BPA), a to jak v samotném krmivu (medián 8,65 ng/g; rozmezí 1,81–31,9 ng/g), tak ve výluzích do metanolu (medián 8,60 ng/ml; rozmezí 2,97–20,8 ng/ml). Statisticky významně vyšší koncentrace BPA byly detekovány ve vnitřní vrstvě obsahu konzerv oproti vrstvě vnější ($p < 0,05$), což odporuje očekávání, že nejvyšší kontaminace bude přítomna v části, která je v přímém kontaktu s obalem. Tato zjištění spíše podporují závěry Goodson et al. (2004), že k největšímu uvolnění BPA dochází bezprostředně po zpracování a sterilizaci konzervy. Zjištěné koncentrace BPA odpovídají hodnotám uváděným ve starší studii Kang and Kondo (2002), ale jsou výrazně nižší než ve výzkumu Behzadi (2023), kde byly použity pokročilejší analytické metody. Přítomnost BPA v konzervovaných krmivech potvrdili i Koestel et al. (2017), a to i u produktů označených jako BPA-free. Na rozdíl od Al Ghoul et al. (2020), kteří nenašli rozdíl mezi vrstvami, byly zaznamenány vyšší koncentrace BPA ve vnitřní části. Podobně jako ve studii Kang and Kondo (2002) byly ve výluzích z prázdných konzerv zjištěny koncentrace BPA (2,97–20,8 ng/ml), přestože byla použita odlišná metodika (methanol vs. autoklávování s destilovanou vodou). Zjištěna byla také významná negativní korelace mezi obsahem BPA ve vnitřní vrstvě a pH ($r = -0,3376$; $p < 0,05$). Ve vnější vrstvě ani mezi obsahem BPA v celkové náplni a výluhu žádná významná korelace prokázána nebyla. Rozdíl pH mezi vrstvami nebyl statisticky významný. Výsledky potvrzují, že krmivo v konzervách představuje relevantní zdroj expozice BPA u psů, což vzhledem k jeho známým negativním účinkům (Sawai et al., 2003; Ni et al., 2023) zasluhuje větší pozornost, a to i s ohledem na chybějící legislativní limity pro zvířecí krmiva na rozdíl od lidské výživy.



Graf 1: Obsah bisfenolu A (BPA) ve vnější a vnitřní vrstvě konzervovaného krmiva pro psy

Závěr

Výsledky potvrdily, že bisfenolem A jsou kontaminovány i psí konzervy. Výrazně vyšší koncentrace BPA byly zjištěny ve vnitřní části obsahu konzervy, což naznačuje, že během skladování nedochází k významnému přenosu BPA z vnitřního okraje konzervy. K objasnění

faktorů ovlivňujících migraci BPA z obalových materiálů do krmiva však bude třeba provést další studie.

Literatura

- AL GHOUL, L., ABIAD, M.G., JAMMOUL, A., MATTA, J., EL DARRA, N. Zinc, aluminium, tin and bis-phenol a in canned tuna fish commercialized in Lebanon and its human risk assessment. *Heliyon* 2002; 6: e04995.
- BEHZADI, M. Determination of bisphenol A, B, F and S in canned foodstuffs and canned pet foods by solid-phase microextraction with polytyramine nanocomposite fiber. *Journal of Food Composition and Analysis* 2023; 117: 88-105.
- BRAUNRATH, R., PODLIPNA, D., PADLESAK, S., CICHNA-MARKL, M. Determination of Bisphenol A in Canned Foods by Immunoaffinity Chromatography, HPLC, and Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(23), 8911–8917.
- DHUEY, E., RUFFLEY, K., PASCALL, M. A. Characterization of morphological changes to an epoxy-based polymer used as a corrosion-preventative lining in retorted canned tomatoes. *Journal of Food Engineering* 2022; 313, 110753.
- FU, P., KAWAMURA, K. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environmental Pollution*. 2010, 158(10), 3138–3143.
- GEENS, T., AERTS, D., BERTHOT, C., et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3725-3740.
- GOODSON, A., ROBIN, A., SUMMERFIELD, W., COOPER, I. Migration of bisphenol A from can coatings - effects of damage, storage conditions and heating. *Food Additives and Contaminants* 2004; 21: 1015-1026.
- KANG, J.H., KONDO, F. Determination of bisphenol A in canned pet foods. *Research in Veterinary Science* 2002; 73: 177-182.
- KOESTEL Z.L., BACKUS, R.C., TSURUTA, K., SPOLLEN, W.G., JOHNSON, S.A., JAVUREK, A.B., ELLERSIECK, M.R., WIEDMEYER, CH.E., KANNAN, K., XUE, J., J. BIVEN, N.J., GIVAN, A., ROSENFELD, CH.S. Bisphenol A (BPA) in the serum of pet dogs following short-term consumption of canned dog food and potential health consequences of exposure to BPA. *Science of the Total Environment* 2016; 579: 1804-1814.
- KOVARIKOVA, S., MARSALEK, P., HABANOVA, M., KONVALINOVA, J. Serum concentration of bisphenol A in elderly cats and its association with clinicopathological findings. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2021; 23: 105-114.
- MARŠÁLEK, P., KOVAŘÍKOVÁ, S., LUEERSEN, F., VEČEREK, V. Determination of bisphenol A in commercial cat food marketed in the Czech Republic. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2022; 24: 160-167.
- NI, L., ZHONG, J., CHI, H., LIN, N., LIU, Z. Recent advances in sources, migration, public health, and surveillance of bisphenol A and its structural analogues in canned food. *Foods* 2023; 12: 1989.
- SAWAI, C., ANDERSON, K., WALSER-KUNTZ, D. Effect of bisphenol A on murine immune function: Modification of interferon- γ , IgG2a, and disease symptoms in NZB $\times$ NZW F1 mice. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111: 1883-1887.
- RUBIN, B.S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 127: 27-34.

Kontaktní adresa: Nad'a Konečná, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23444@vf.u.cz

Aktivita a projevy chování brojlerových kuřat v domácím chovu a velkochovu

Activity and Behavioral Patterns of Broiler Chickens in Backyard and Intensive Farming Systems

Mikuláš Michael Kálnoky, Eva Voslášková

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Summary

This thesis focuses on a comparative analysis of the behavioral patterns of broiler chickens reared in intensive large-scale farming systems and backyard extensive environments. The key focus is on the occurrence of natural ethological behavior and its dependence on husbandry conditions. In both observed systems, the same genetic material was used a fast-growing meat hybrid which enabled an objective comparison without genetic predisposition bias. The observations revealed that broilers in backyard settings more frequently exhibited behavior typical of natural living conditions, such as environmental exploration, scratching, foraging, social interactions, and comfort behaviors. In contrast, broilers in intensive production systems predominantly displayed sedentary behavior, limited locomotion, and excessive feed intake. Significant differences were also noted in the duration of the fattening cycle, spatial allowance, and environmental enrichment, all of which had a considerable impact on the overall welfare of the animals.

Keywords: broiler chickens; breeding system; welfare; intensive farming; alternative housing system

Úvod

V současné době je kuřecí maso stále více oblíbeným a jeho celková spotřeba postupně stoupá. Brojlerová kuřata pro produkci masa jsou pro účely klasického prodeje na pultech obchodů chována ve velkochovech, kde je na jejich etologické potřeby kladen jen malý ohled. Alternativou k centralizovaným velkochovům mohou být domácí malochovy, ve kterých si chovatel chová malé množství brojlerů většinou pro svou vlastní spotřebu.

Metody odchovu brojlerových kuřat se liší podle velikosti chovu, cílového trhu a dostupných zdrojů. Nejčastěji se v intenzivních velkochovech využívá systém hluboké podestýlky, který je ekonomicky výhodný, ale zároveň vyžaduje pečlivou kontrolu vlhkosti a hygieny. Tento systém je doplněn principem all-in all-out, kdy jsou kuřata chována ve várkách a po jejich odchovu je prostor kompletně vydezinfikován, což minimalizuje riziko přenosu nemocí. Naopak v malochovech, kde je často nižší hustota chovu a větší prostor pro pohyb, se kombinuje vnitřní ustájení s přístupem na venkovní výběhy. Vícečetné várky jsou běžné v komerčních provozech, které vyžadují plynulou produkci masa (Buijs, 2009).

Mezi nejčastější problémy, se kterými se chovatelé brojlerových kuřat setkávají, patří zdravotní komplikace spojené s rychlým růstem hybridů. Mezi nejvýznamnější patří kulhání, srdeční selhání (ascites) a záněty prsní kosti, známé jako breast blisters. Rychlý růst, který je u Cornish Cross běžný, vede k vyšší mortalitě ve srovnání s pomaleji rostoucími plemeny. Dalším problémem je kvalita podestýlky. Její vlhkost a tvrdost přímo ovlivňují výskyt kožních lézí a infekcí. Welfare brojlerů je také často diskutovanou problematikou, protože omezený pohyb a nemožnost realizovat přirozené chování vedou k etickým otázkám (Kestin, 1992).

Etologické obohacení chovů brojlerových kuřat představuje významný krok ke zlepšení jejich welfare. Zavedení prvků jako jsou platformy a hřady umožňuje kuřatům lépe rozvíjet svalstvo a snižuje výskyt kožních lézí. Přístup k venkovním prostorům, který je častější v malochovech,

zlepšuje svalovou kondici a kvalitu masa díky většímu pohybu a přirozenému prostředí. Dalšími formami obohacení jsou prachové koupele a balíky slámy, které stimulují exploraci a snižují stresové chování. Zatímco v malochovech je možné tyto prvky snadněji implementovat, ve velkochovech často dominuje tlak na maximální efektivitu produkce, což může tyto možnosti omezovat (Bach, 2019).

Doba odchovu brojlerových kuřat se výrazně liší v závislosti na typu chovu a použitých hybridů. Ve velkochovech dosahují hybridní brojleři porážkové hmotnosti obvykle během pěti až šesti týdnů, což je umožněno intenzivními krmnými dávkami a optimalizovanými podmínkami prostředí. Naopak v malochovech, trvá odchov o mnoho delší dobu. Tento rozdíl je důsledkem nižší intenzity krmení, většího prostoru, menší schopnosti chovatele udržovat stále podmínky z pohledu mikroklimatu a často i přístupu k venkovním výběhům (Robins, 2011).

Materiál a metodika

V rámci studie byla provedena série etologických pozorování brojlerových kuřat v domácím malochovu a v komerčním halovém velkochovu. Každé pozorování trvalo 30 minut a bylo sledováno vždy 10 vybraných jedinců. Během těchto sezení byly do předem připravené tabulky zaznamenávány vybrané projevy chování, mezi které patřil příjem potravy, posedávání či odpočinek, příjem vody, vylučování, hrabání, hledání v podestýlce, popelení, hravé chování a mávání křídly. Pro vyhodnocení naměřených dat byl použit statistický program UNISTAT, přičemž k analýze vztahů mezi jednotlivými behaviorálními projevy a typem chovu byl zvolen Spearmanův korelační koeficient. Výsledky byly následně porovnány mezi halovým a domácím chovem s cílem identifikovat rozdíly v etologickém projevu kuřat v závislosti na podmínkách chovu.

Výsledky

Statistická analýza prokázala významné rozdíly v projevech chování brojlerových kuřat mezi halovým velkochovem a domácím malochovem. Ve skupině chovaných v domácím prostředí bylo výrazně častější a intenzivnější chování spojené s hrabáním v podestýlce, aktivním vyhledáváním potravy, popocházením po prostoru, máváním křídly a popelením. Tyto rozdíly byly statisticky vysoce významné, což svědčí o větší aktivitě a rozmanitosti etologických projevů kuřat v malochovu. Naopak v halovém velkochovu bylo zaznamenáno častější ležení a sezení, stejně jako strnulé stání, což naznačuje omezenější pohybovou aktivitu. Dále bylo zjištěno, že kuřata ve velkochovu věnovala více času příjmu potravy.

Závěr a diskuse

Výsledky našeho pozorování jasně ukazují, že brojlerová kuřata chovaná v domácím malochovu vykazují výrazně širší spektrum přirozených behaviorálních projevů, jako jsou hrabání v podestýlce, aktivní vyhledávání potravy, pohyb po prostoru, mávání křídly a popelení, což svědčí o lepším etologickém obohacení a vyšší kvalitě welfare. Naopak kuřata ve velkochovu, kde jsou podmínky více standardizované a prostor omezený, tráví více času ležením, sezením a strnulým stáním, a zároveň věnují více času příjmu potravy, což odráží intenzivní režim krmení a omezenou možnost pohybu. Domácí chovy, přestože poskytují přirozenější prostředí a větší volnost pohybu, jsou však více vystaveny vlivům povětrnostních podmínek, které nelze vždy dostatečně regulovat, zejména co se týče teplotních extrémů v létě či na jaře a podzim, což může negativně ovlivnit komfort a zdraví brojlerů. V zimních měsících je z tohoto důvodu odchov brojlerů v domácích podmínkách často omezený nebo přerušovaný. Celkově lze tedy říci, že ačkoliv domácí malochovy z hlediska etologie a welfare představují pro brojlerová kuřata lepší podmínky, velkochovy nabízejí výhodu stabilního a kontrolovaného

prostředí, které umožňuje efektivní produkci masa. Ideálním směrem do budoucna je proto snaha o kombinaci těchto přístupů, tedy zavádění etologického obohacení i do velkochovů, aby bylo možné dosáhnout rovnováhy mezi ekonomickou efektivitou a zajištěním dobrých životních podmínek zvířat.

Literatura

BACH, M.H. et al. Effects of environmental complexity on behaviour in fast-growing broiler chickens. *Applied Animal Behaviour Science*. 2019, vol. 219, s. 104840. [cit. 2025-04-06]. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000500193300011>

BUIJS, S. et al. Stocking density effects on broiler welfare: Identifying sensitive ranges for different indicators. *Poultry Science*. 2009, vol. 88, no. 8, s. 1536–1543. [cit. 2025-04-06]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/26659156_Stocking_density_effects_on_broiler_welfare_Identifying_sensitive_ranges_for_different_indicators

KESTIN, S.C., KNOWLES, T.G. a TINCH, A.E. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Veterinary Record*. 1992, vol. 131, s. 190–194. [cit. 2025-04-06]. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:A1992JL99800004>

ROBINS, A. a PHILLIPS, C.J.C. International approaches to the welfare of meat chickens. *World's Poultry Science Journal*. 2011, vol. 67, s. 351–369. [cit. 2025-04-06]. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000292273500012>

Kontaktní adresa: Mikuláš Michael Kálnoky, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H24009@vfu.cz

Effect of housing type on guinea pig behaviour

Vacušková Zdeňka, Vacuška Dominik, Večerek Vladimír

Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic

Summary

Housing type can be an important factor from the perspective of animal welfare. The aim of this study was to assess the suitability of two different bedding materials—wood shavings (a potentially dusty environment) and fleece liners (a dust-free alternative) by evaluating the behaviour of guinea pigs. Ethological observations were conducted on five guinea pigs over six consecutive days using video recordings. The results indicate that the most frequently observed elements of general activity were standing and locomotion, with no statistically significant differences between housing types ($p > 0.05$). Lying occurred more often on fleece liners than on wood shavings ($p = 0.0381$). Comfort behaviours such as shaking, face grooming, nibbling, and licking were significantly more frequent on wood shavings ($p = 0.0000$), while scratching did not differ significantly. These findings suggest that bedding type can influence the expression of comfort behaviour and may have implications for guinea pig welfare.

Keywords: *welfare; behaviour; wood shavings; fleece liners*

Introduction

Among the aspects of the physical environment of animals is the housing system (Mellor et al., 2020), which can negatively affect animal welfare when conditions are suboptimal (Rooney et al., 2014). In animal husbandry, bedding material is an important environmental factor (Besch, 1980), particularly in relation to maintaining the health and welfare of housed animals (Wirth, 1983). According to Vogt et al. (2021), wood shavings are one of the most commonly used bedding materials. However, Yasotha and Areskhumar (2020) note that wood shavings are generally not recommended as bedding due to the risk of respiratory issues when not replaced frequently enough by owners. The use of fleece liners as a bedding-free housing alternative is becoming increasingly popular among pet owners (Cameron et al., 2022). Observing animal behaviour has become a valuable non-invasive method for assessing animal welfare (Dawkins, 2004). When evaluating welfare, it is important to analyse both natural behaviours and the potential presence of abnormal behaviours (Rushen et al., 2012). One of the natural behavioural patterns that may provide insight into welfare status in guinea pigs is grooming behaviour. According to Rood (1972), grooming is a socially positive behaviour in guinea pigs. Grooming is widespread in guinea pigs and may serve various functions – from removing dust and parasites (Spruijt et al., 1992) to supporting social cohesion within a stable group (Rood, 1972).

The aim of this study was to evaluate the effect of dusty and dust-free environment on the guinea pig behaviour – especially grooming behaviour.

Materials and methods

The assessment of the influence of different housing types (dusty vs. dust-free) on the behaviour of domestic guinea pigs was conducted in a breeding facility specializing in the US Teddy breed. The study included five female guinea pigs aged 3–4 years. Behavioural observations were carried out in an enriched cage measuring 110×70 cm over six consecutive days between 08:00 and 20:00. During the first three days, wood shavings were used as bedding. On the fourth day, the cage was cleaned and fleece liners were used as bedding for the remaining observation period. Guinea pigs had ad libitum access to hay and water throughout the study. Video recordings were captured using Sony AX53 cameras positioned 1.5 meters from the cage. The

recordings were subsequently analysed using continuous data recording in the software Noldus Observer XT 17 (Noldus Information Technology, The Netherlands). For the analysis, morning (08:00–10:00) and afternoon (14:00–16:00) segments were evaluated. For each individual, elements of general activity (standing, lying, locomotion) and comfort behaviour (shaking, face grooming, scratching, nibbling, and licking) were recorded. The frequencies of the observed behaviours were statistically analysed using Unistat for Excel software and the Chi-square (χ^2) test. A p-value > 0.05 was considered statistically non-significant, $p < 0.05$ as statistically significant, and $p < 0.01$ as highly significant.

Results and discussion

Based on the analysis of the behavioural patterns of guinea pigs housed on wood shavings and fleece liners, the most frequently recorded elements of general activity were standing and locomotion. No statistically significant differences in the frequency of these behaviours were found between the two housing conditions ($p > 0.05$). Lying was observed relatively infrequently, accounting for only 11.32% on wood shavings and 12.99% on fleece liners. This difference in lying frequency was evaluated as statistically significant ($p = 0.0381$). Differences in the frequency of comfort behaviours were also observed between the two bedding types, with these behaviours being more frequently recorded in the wood shavings condition compared to the fleece liners. Statistically highly significant differences ($p = 0.0000$) were found in the frequencies of shaking, face grooming, nibbling, and licking. No statistically significant difference was found for scratching ($p > 0.05$).

Table 1: Behavioural elements (%) in guinea pigs on wood shavings and fleece liners

		Wood shaving	Fleece liners
General activity	Standing	50,22	48,25
	Laying	11,32	12,99
	Locomotion	38,45	38,76
Comfort behaviour	Shaking	12,68	8,22
	Face grooming	4,37	1,64
	Scratching	34,20	34,19
	Nibbling, licking	48,75	55,95

Wood shavings are considered by some authors to be an unsuitable type of bedding, as they may cause environmental dustiness and related respiratory issues (Yasothea and Areskhumar, 2020). In our study, guinea pigs were found to engage more frequently in body grooming when housed on wood shavings. Similarly, Poornima and Ahamed (2018) reported that guinea pigs groom more on wood shavings compared to fleece liners. Kawakami et al. (2003) compared two different types of bedding – paper bedding and wood shavings. Although it could be assumed that paper bedding would result in a less dusty environment, their study showed that grooming occurred more frequently on paper bedding compared to wood shavings, although the difference was not statistically significant. As noted by Berridge (1990), body grooming is among the most commonly performed behavioural activities in guinea pigs, and the increased incidence of grooming on wood shavings observed in our study may not necessarily indicate a dust-related problem, but could also represent a form of socially positive behaviour (Rood, 1972).

Conclusion

The present study indicates that the type of bedding material can influence the expression of certain behaviours in guinea pigs. While general activity levels such as standing and locomotion did not differ significantly between animals housed on wood shavings and fleece liners, lying occurred more frequently on fleece liners. Comfort behaviours were generally more frequent in the wood shavings condition, with statistically significant differences observed for shaking, face grooming, nibbling, and licking. These results suggest that bedding type may affect not only comfort behaviour but potentially also the overall welfare of guinea pigs. Further research is needed to explore the long-term welfare implications of fleece liners, which are becoming increasingly popular among pet owners.

Literature

BERRIDGE, K.C. Comparative fine structure of action: Rules of form and sequence in the grooming patterns of six dorent species. *Behaviour*. 1990, vol. 113, s. 21-56.

BESCH, E.L. Environmental quality within animal facilities. *Laboratory Animal Science*. 1980, vol. 30, s. 385-406.

CAMERON, K.E., HOLDER, H.E., CONNOR, R.L., GEAR, R.N.A. Cross-sectional survey of husbandry for pet guinea pigs (*Cavia porcellus*) in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. 2022, vol. 71, s. 27-32.

DAWKINS, M.S. Using behavior to assess animalwelfare. *Animal Welfare*. 2004, vol. 13, s. 3–7.

KAWAKAMI, K., TAKEUCHI, T., YAMAGUCHI, S., AGO, A., NOMURA, M., GONDA, T., KOMEMUSHI, S. Preference of guinea pigs for bedding materials: wood shaving versus paper cutting sheet. *Experimental Animals*. 2003, vol. 52, s. 11-15.

MELLOR, D.J., BEAUSOLEIL, N.J., LITTLEWOOD, K.E., MCLEAN, A.N., MCGREEVY, P.D., JONES, B., WILKINS, C. The 2020 five domains model: including human-animal interaction in assessments of animal welfare. *Animals*. 2020, vol. 10, s. 1870.

POORNIMA, N.S., AHAMED, R. Preliminary studies of grooming behavior of domestic american guinea pig (*Cavia porcellus*). 2018. In: 8th International Symposium 2018 SEUSL, South Eastern University of Sri Lanka, s. 133-140.

ROOD, J.P. Ecological and behavioural comparisons of three genera of Argentine cavies. *Animal Behaviour Monographs*. 1972, vol. 5, s. 1-83.

ROONEY, N.J., BLACKWELL, E.J., MULLAN, S.M., SAUNDERS, R., BAKER, P.E., HILL, J.M., SEALEY, C.E., TURNER, M.J., HELD, S.D.E. The current state of welfare, housing and husbandry of the English pet rabbit population. *BMC Research Notes*. 2014, vol. 7, s. 942.

RUSHEN, J., CHAPINAL, N., DE PASSILLÉ, A.M. Automated monitoring of behavioral-based animal welfare indicators. *Animal Welfare*. 2012, vol. 21, s. 339-350.

SPRUIJT, B.M., VAN, HOOFF, J.A., GISPEN, W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Behaviour*. 1992, vol. 72, s. 825-852.

VOGT, M.A., GEIGER, L.M.J., HÄRTEL, T., FOLLERT, P., PALME, R., CHOURBAJI, S. Evaluation of potential sustainable bedding substrates focusing on preference, behavior and stress physiology in rats – A pilot study. *Animals*. 2021, vol. 11, s. 1375.

WIRTH, H. Criteria for the evaluation of laboratory animal bedding. *Laboratory Animals*. 1983, vol. 17, s. 81-84.

YASOTHA, A., ARESHKUMAR, M. Guinea pig and its husbandry. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2020, vol. 8, s. 1876-1877.

Contact address: Vacušková Zdeňka, Mgr., Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22346@vfu.cz

Calming signals and changes in surface temperature in therapy dogs

Vacuška Dominik, Vacušková Zdeňka, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

Summary

This study aimed to evaluate stress-related behavioral indicators and changes in surface temperature in therapy dogs during their work sessions. Using infrared thermography, the inner canthus temperature of 12 certified Golden Retrievers was recorded in one-minute intervals, while behavior was simultaneously analyzed through video recordings. The most frequently observed behaviors were licking and the so-called "whale eye." Both the dogs' surface temperature and the frequency of stress-related behaviors significantly increased with the duration of the therapy session, with a noticeable threshold around 20–25 minutes. These findings suggest that session length can critically influence animal welfare and should be carefully considered when planning therapy sessions.

Keywords: *welfare; infrared thermography; ethology; canine-assisted therapy; dog behavior*

Introduction

Although current research in animal-assisted therapy is increasingly aligning with the One Health concept, the environment in which therapy dogs operate may pose a risk of stress overload for them (Glenk, 2017; Menna et al., 2019; Cortesi et al., 2024). Assessing animal welfare ideally involves a combination of several methods. One non-invasive method for examining stress responses in animals is the use of infrared thermography (IRT imaging technology) (Travain et al., 2015; Zheng et al., 2022). The method's validity is supported by results obtained across a variety of animal species (Zheng et al., 2022). However, measurements can be influenced by factors such as ambient temperature, direct heat sources, air currents, or humidity, which must be controlled (Travain and Valsecchi, 2021).

Facial expressions, posture changes, combinations of behavior elements, or varying behavior frequencies depending on environmental conditions are considered sensitive indicators of an individual's emotional state (Bremhorst et al., 2019; Flint et al., 2024). The most commonly cited behavioral manifestations associated with stress include startle reactions, increased locomotion, panting, dilated pupils, the so-called "whale eye," gaze aversion, trembling, whining, excessive licking, yawning, hiding, paw lifting, and lowered body posture (Beerda et al., 1999; Beerda et al., 2000; Dreschel and Granger, 2005).

An organism's response is, however, the result of individual perception of the situation and other influencing factors (Haubenhofner and Kirchengast, 2007). These include age, experience, training (including habituation to specific contexts), environmental predictability, new social-ecological settings, client characteristics, and microclimatic conditions (Haubenhofner et al., 2005; King et al., 2011; Glenk et al., 2013; 2014; Ng et al., 2014). It remains a subject of research whether these behaviors are signs of negative stress or positive arousal (Haubenhofner and Kirchengast, 2006; Clark et al., 2020). Given the growing global interest in therapy dog work, ensuring their welfare and identifying conditions that may compromise their well-being are crucial goals of scientific inquiry (Glenk and Foltin, 2021; de Winkel et al., 2024).

Materials and Methods

Twelve certified Golden Retrievers were used to analyze behavioral expressions and surface temperature changes. Based on the literature, the following behaviors were evaluated: licking, gaze aversion, whale eye, seeking eye contact with the handler, shaking off, attempting to leave, and paw lifting. Continuous video recordings were made during five-minute therapy sessions using two Sony AX53 video cameras and analyzed with The Observer XT software (Noldus

Information Technology, Netherlands). Surface temperature was measured for each dog after each five-minute interval.

For each female dog, surface temperature was repeatedly recorded from the inner corner of the eye using a Testo 890-2 thermal camera (Testo SE & Co. KGaA, Germany) with an emissivity setting of 0.98 (Zheng et al., 2022). Frequencies of behavioral expressions were statistically evaluated using the Chi-squared test in Unistat 5.6 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). The same software was used for analyzing surface temperature data. A normality test (Shapiro-Wilk) was conducted first, followed by ANOVA and Tukey-HSD tests based on its outcome. A significance level of $p < 0.05$ was applied.

Results and Discussion

At the start of the therapy sessions, the mean surface temperature of the dogs' inner eye corner was 36.93 ± 0.92 °C. In subsequent measurements, temperature increased, peaking at 38.78 ± 0.49 °C after 35 minutes. This rise may be attributed to factors such as bed temperature or the initiation of direct interaction with a patient (Ng et al., 2014; Travain and Valsecchi, 2021). The temperature difference was statistically significant ($p = 0.0132$).

The most frequently recorded behaviors were licking and whale eye ($p < 0.01$), with licking occurring more often ($p = 0.0026$). Oral behaviors, especially licking, are commonly used by dogs in stressful situations (Beerda et al., 1999). As session duration increased, the frequency of all monitored behaviors also rose significantly ($p < 0.01$). Notably, there was a significant increase in licking ($p = 0.0007$), whale eye ($p = 0.0063$), gaze aversion ($p = 0.0014$), and seeking the handler ($p = 0.0003$).

These findings align with earlier studies showing that therapy duration, time of day, and number of sessions per unit time affect behavioral responses (Haubenhofner and Kirchengast, 2006; Haubenhofner and Kirchengast, 2007). The most substantial increase in stress-related behaviors occurred between 20 and 25 minutes into the session. A highly significant difference was found between the 15–20 minute and 25–30 minute intervals ($p = 0.0047$). However, this time threshold cannot be universally applied to all therapy activities due to previously mentioned influencing factors (Haubenhofner et al., 2005; King et al., 2011; Glenk et al., 2013; 2014; Ng et al., 2014).

Conclusion

The results of this study indicate that therapy dogs experience changes in surface temperature and the frequency of stress-related behaviors during therapy sessions. The duration of the activity proved to be a significant factor influencing the animals' welfare. It is recommended that therapy sessions do not exceed an individually tailored time limit and that signs of stress be monitored throughout interventions to protect the dogs' well-being.

Literatura

- BEERDA, B., SCHILDER, M. B. H., VAN HOOFF, J. A. R. A. M., DE VRIES, H. W., MOL, J. A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior*. 1999, vol. 66, no. 2, s. 233-242.
- BEERDA, B., SCHILDER, M. B. H., VAN HOOFF, J. A. R. A. M., DE VRIES, H. W., MOL, J. A. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare*. 2000, vol. 9, no. 1, s. 49-62.
- BREMHORST, A., SUTTER, N. A., WÜRBEL, H., MILLS, D. S., RIEMER, S. Differences in facial expressions during positive anticipation and frustration in dogs awaiting a reward. *Scientific Reports*. 2019, vol. 9: 19312.
- CLARK, S.D., MARTIN, F., MCGOWAM, R.T.S., SMIDT, J.M., ANDERSON, R., WANG, L., TURPIN, T., LANGENFELD-MCCOY, N., BAUER, B.A., MOHABBAT, A.B. Physiological state of therapy dogs during animal-assisted activities in an outpatient setting. *Animals*, 2020, vol. 10: 819.

- CORTESI, B.C., PALESTRINI, C., BUTTRAM, D., CANNAS, S. Stress and burnout in dogs involved in animal assisted interventions: A survey of Italian handlers' opinion. 2024, Available at SSRN 4870618.
- DE WINKEL, T., VAN DER STEEM, S., ENDERS-SLEGERS, M.J., GRIFFIONEN, R., HAVERBEKE, A., GROENEWOUD, D., HEDIGER, K. Observational behaviors and emotions to assess welfare of dogs: A systematic review. *Journal of Veterinary Behavior*, 2024, vol. 72. s. 1-17.
- DRESCHER, N. A., GRANGER, D.A. Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. *Applied Animal Behaviour Science*. 2005, vol. 95, no. 3-4, s. 153-168.
- FLINT, H.E., WELLER, J.E., PARRY-HOWELLS, N., ELLERBY, Z.W., MCKAY, S.L., KING, T. Evaluation of indicators of acute emotional states in dogs. *Scientific Reports*, 2024, vol. 14: 6460.
- GLENK, L. M., KOTHGASSNER, O. D., STETINA, B. U., PALME, R., KEPPLINGER, B., BARAN, H. Therapy dogs' salivary cortisol levels vary during animal-assisted interventions. *Animal Welfare*. 2013, vol. 22, no. 3, s. 369-378.
- GLENK, L. M., KOTHGASSNER, O. D., STETINA, B. U., PALME, R., KEPPLINGER, B., BARAN, H. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*. 2014, vol. 9, no. 3, s. 98-106.
- GLENK, L.M. Current perspectives on therapy dog welfare in animal-assisted interventions. *Animals*. 2017, vol. 7, no. 2: 7.
- GLENK, L.M., FOLTIN, S. Therapy dog welfare revisited: A review of the literature. *Veterinary sciences*, 2021, vol. 8: 226.
- HAUBENHOFER, D. K., KIRCHENGAST, S. Physiological arousal for companion dogs working with their owners in animal-assisted activities and animal-assisted therapy. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 2006, vol. 9, no. 2, s. 165-172.
- HAUBENHOFER, D. K., KIRCHENGAST, S. Dog handlers and dogs emotional and cortisol secretion responses associated with animal-assisted therapy sessions. *Society & Animals*. 2007, vol. 15, s. 127-150.
- HAUBENHOFER, D., MÖSTL, E., KIRCHENGAST, S. Cortisol concentrations in saliva of humans and their dogs during intensive training courses in animal-assisted therapy. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 2005, vol. 92, no. 3, s. 66-73.
- KING, C., WATTERS, J., MUNGRE, S. Effect of a time-out session with working animal-assisted therapy dogs. *Journal of Veterinary Behavior*. 2011, vol. 6, no. 4, s. 232-238.
- MENNA, L.F., SANTANIELLO, A., TODISCO, M., AMATO, A., BORRELLI, L., SCANDURRA, C., FIORETTI, A. . The human-animal relationship as the focus of animal-assisted interventions: A one health approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, vol. 16: 3360.
- NG, Z. Y., PIERCE, B. J., OTTO, C. M., BUECHNER-MAXWELL, V. A., SIRACUSA, C., WERRE, S. R. The effect of dog-human interaction on cortisol and behavior in registered animal-assisted activity dogs. *Applied Animal Behaviour Science*. 2014, vol. 159, s. 69-81.
- TRAVAIN, T., COLOMBO, E. S., HEINZL, E., BELLUCCI, D., PREVIDE, E. P., VALSECCHI, P. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*) – A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 2015, 10: 17-23.
- TRAVAIN, T., VALSECCHI, P. Infrared thermography in the study of animals' emotional responses: Critical review. *Animals*, 2021, 11: 2510.
- ZHENG, S., ZHOU, C., JIANG, X., HUANG, J., XU, D. Progress on infrared imaging technology in animal production: A review. *Sensors*, 2022, vol. 22. no. 33: 705.

Kontaktní adresa: Vacuška Dominik, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22345@vfu.cz

Effect of lamotrigine on early developmental stages of zebrafish (*Danio rerio*) – behavioural study

¹Hesova, R., ¹Riesova, B., ¹Svobodova, Z., ¹Linhart, P., ^{2,3}Heloysa Araujo-Silva, ³Christian Tudorache, ¹Lakdawala, P.

¹University of Veterinary Sciences Brno, Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Brno, Czech Republic

²Graduate Program in Psychobiology, Biosciences Centre, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

³Institute of Biology, Leiden University, Leiden, The Netherlands

Summary

Lamotrigine (LTG) is a widely prescribed antiepileptic drug that has been increasingly detected in surface waters due to its poor removal during wastewater treatment. This study aimed to evaluate the behavioural effects of environmentally relevant concentrations of LTG on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. Larvae exposed to 0.1 µg/L and 100 µg/L LTG exhibited significantly increased locomotor activity compared to controls during both light and dark phases of the Light Dark Challenge (LDC) test. These results suggest that LTG may interfere with normal behavioural patterns in early developmental stages. To our knowledge, this is the first study reporting such effects of LTG in fish, emphasising the need for further ecotoxicological assessment of this pharmaceutical compound.

Keywords: antiepileptics; drugs; embryo; fish; toxicity

Introduction

Lamotrigine (LTG) is an antiepileptic drug commonly prescribed for the treatment of partial seizures, primary generalised tonic-clonic seizures, Lennox-Gastaut syndrome, and for the maintenance therapy of bipolar I disorder. In addition to its approved indications, LTG is also used off-label in the management of conditions such as acute bipolar depression, fibromyalgia, schizophrenia, and unipolar depression (Betchel et al., 2023). Although LTG undergoes partial metabolism in the human body, a significant fraction - approximately 10% - is excreted in its unchanged form. As conventional wastewater treatment technologies are not specifically designed to remove pharmaceuticals, lamotrigine can pass through treatment processes and enter aquatic ecosystems (Ferencik et al., 2022). The presence of such contaminants in the environment has raised growing concerns due to their potential effects on non-target aquatic organisms. Behavioural endpoints in fish and other vertebrates provide a sensitive and ecologically relevant way to detect sublethal effects of these substances (Ferencik et al., 2022).

This study aimed to evaluate the effects of lamotrigine exposure on the behaviour of developing aquatic vertebrates, specifically the early developmental stages of the zebrafish (*Danio rerio*).

Materials and Methods

Wild-type zebrafish (AB/TL strain) embryos were collected from breeding pairs, cleaned with embryo water (1.2 g of sea salts and 0.25 mL methylene blue per 20 L of Milli-Q water), and pooled to ensure genetic diversity. Non-viable embryos were removed under a stereomicroscope, and the remaining embryos were assigned to control and treatment groups.

LTG exposure was carried out at two concentrations: 0.1 µg/L and 100 µg/L. These concentrations correlated with those chosen in previously conducted acute toxicity tests at the University of Veterinary Sciences Brno for gene expression analysis, with the lowest concentration always corresponding to the environmental concentration. Embryos were

incubated under standard conditions (28.5 ± 0.5 °C; 14/10 h light/dark cycle), with daily solution renewal.

At 5 days post-fertilisation (dpf), larvae were subjected to the Light Dark Challenge (LDC; DanioVision™, Noldus Inc., Wageningen, Netherlands) test to assess anxiety-like behaviour. A total of 48 larvae per concentration were individually placed in 48-well microtiter plates (1 larva/well). The LDC test of a total duration of 1 hour consisted of 30 minutes of light habituation, followed by 7.5 minutes of darkness, 7.5 minutes of light, 7.5 minutes of darkness and 7.5 minutes of light. Larval behaviour was recorded using EthoVision™ XT software (Noldus Inc., Wageningen, Netherlands). Parameters analysed included total distance moved and angular velocity. Finally, the results were statistically evaluated using Unistat 6.5 for Excel software.

Results and Discussion

The locomotor activity, as the main behavioural parameter, of zebrafish larvae was significantly altered (Fig. 1) by exposure to both tested concentrations of lamotrigine (LTG 0.1 µg/L and 100 µg/L), with both groups exhibiting increased swimming distance compared to the control group. However, no statistically significant difference was observed between the two LTG concentrations. In the control group, larvae displayed typical LDC behaviour, with lower activity during light and increased activity during darkness. In contrast, LTG-exposed groups showed elevated activity during both light and dark phases, indicating a disrupted response to the LDC challenge.

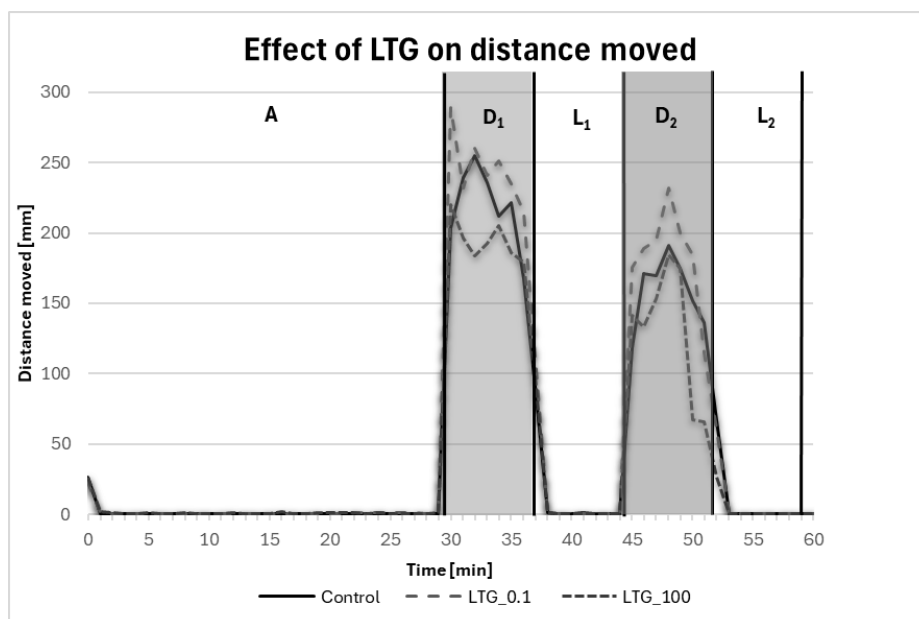


Figure 1. Representative graph of the light-dark test: After an initial acclimatisation in the illuminated chamber (A) that lasted 30 min, larvae were subjected to a dark challenge phase for 7.5 min (D1) and another light challenge phase for 7.5 min (L1). This chain of dark and light phases was repeated once (D2-L2), so that two dark and light phases were alternated. Swimming activity as a function of distance moved (mm) typically showed low levels during acclimatisation, increased levels during the dark challenge phase, and decreased levels during the light challenge phase (median, N = 60).

To our knowledge, no studies have yet reported acute or chronic behavioural effects of environmentally relevant LTG concentrations on fish. Our results demonstrate for the first time that LTG in surface waters may affect behavioural endpoints in aquatic organisms.

Our results are consistent with previous research on gabapentin (GBP), where zebrafish larvae showed increased locomotor activity after exposure to environmentally relevant and higher concentrations. Both GBP and LTG increased activity during LDC, suggesting a possible shared impact on neuromotor regulation. Unlike GBP, which showed a concentration-dependent response, LTG did not differ significantly between concentrations, likely due to differences in their pharmacological targets - GBP modulates calcium channels via the $\alpha 2\delta$ subunit, while LTG blocks voltage-gated sodium channels. Notably, to date, GBP has only been tested in embryotoxicity assays with zebrafish (He et al. 2019), making our study among the first to compare its behavioural effects with those of LTG. The evaluation of behavioural data is still ongoing and will be supplemented with gene expression analysis of stress-related markers to provide further insight into the potential mechanisms of LTG action in early fish development.

Conclusion

The presence of LTG in aquatic environments may influence the behaviour of aquatic organisms, potentially disrupting natural activity patterns and ecological interactions. Such disturbances may interfere with predator-prey dynamics, reproductive behaviours, or other vital processes, ultimately affecting ecosystem stability. The inefficient removal of LTG during conventional wastewater treatment processes highlights the need to improve filtration technologies or develop strategies to limit pharmaceutical discharge into surface waters. The observed increase in locomotor activity in zebrafish larvae emphasises the importance of examining behavioural endpoints in ecotoxicological assessments. Our findings contribute to a growing body of evidence showing that neuroactive pharmaceuticals may affect non-target species even at low concentrations. As LTG acts on voltage-gated sodium channels in the central nervous system, it may interfere with neural signalling and behaviour in aquatic vertebrates. These initial findings support concerns about the broader implications of human pharmaceuticals on wildlife. Ongoing gene expression analyses will provide further insights into how LTG exposure modulates the activity of stress-related genes in zebrafish, potentially clarifying the underlying molecular mechanisms of the observed behavioural alterations.

Acknowledgement

This scientific work was supported by the Internal Grant Agency of the Veterinary University Brno, project number 219/2023/FVHE.

References

- BETCHEL, NT, FARIBA, KA, SAADABADI, A. Lamotrigine. [Updated 2023 Feb 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470442/>
- FERENCIK, M., BLAHOVA, J., SCHOVANKOVA, J., SIROKA, Z., SVOBODOVA, Z., KODES, V., STEPANKOVA, K., LAKDAWALA, P. Residues of Selected Anticonvulsive Drugs in Surface Waters of the Elbe River Basin (Czech Republic). *Water* (Basel, Switz.). 2022, vol. 14, no. 24, 4122. doi: 10.3390/w14244122
- HE, Y, LI, X, JIA, D, ZHANG, W, ZHANG, T et al. A transcriptomics-based analysis of the toxicity mechanisms of gabapentin to zebrafish embryos at realistic environmental concentrations. *Environmental Pollution*. 2019, vol. 251, 746-755. doi: 10.1016/j.envpol.2019.05.063

Kontaktní adresa: Renáta Hesová, Mgr. Bc., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, hesovar@vfu.cz

Působení vzdálenosti přepravy a ročního období jako synergických faktorů na počty úhynů brojlerů kura domácího a kachen domácích při jejich přepravě na jatky

The effect of transport distance and season as synergistic factors on the mortality rates of broilers and ducks during their transport to slaughterhouses

¹Justová Eva, ¹Večerek Vladimír, ¹Voslářová Eva, ²Semerád Zbyněk

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

²Státní veterinární správa

Summary

This study investigates the synergistic effects of two key factors – season and transport distance – on mortality rates of broiler chickens and ducks during transport to slaughterhouses. Data from the Czech State Veterinary Administration inspections (2017–2023) were analyzed, encompassing over 807,9 million broilers and 28 million ducks. Transport distances were categorized into five intervals (≤ 50 km to >300 km) and seasons into four (spring to winter). Mortality rates were compared across these variables and their combinations using χ^2 tests ($p \leq 0.05$). In broilers, the highest mortality (up to 0.884%) was observed in winter and during long-distance transports. In ducks, the greatest mortality (up to 0.589%) occurred during summer and long-distance transports. The results confirm a significant synergistic interaction between season and transport distance. These findings highlight critical risk combinations negatively impacting poultry welfare during transport.

Keywords: Welfare; Transport stress; Poultry

Úvod

Práce je zaměřena na zjišťování synergického působení faktoru ročního období a faktoru přepravní vzdálenosti na počty uhynulé, utracené a přeražené drůbeže – brojlerů kura domácího a kachen - na nutnou porážku (dále jen úhyny) při přepravě na jatky.

Materiál a metodika

Práce se opírá o údaje z dozorové činnosti úředních veterinárních lékařů nad přepravou zvířat na jatky z období let 2017 až 2023. Byla hodnocena přeprava drůbeže v členění na brojlerů (kura domácího) (807 874 546 zvířat) a kachny (28 012 184 zvířat). Roční období bylo rozděleno na období jaro (březen, duben a květen), léto (červen, červenec a srpen), podzim (září, říjen a listopad) a zimu (prosinec, leden a únor). Přepravní vzdálenosti byly rozděleny s ohledem na sledované území na přepravu na velmi krátkou vzdálenost do 50 km, krátkou vzdálenost od 51 do 100 km, střední vzdálenost od 101 do 200 km, dlouhou vzdálenost 201 až 300 km a velmi dlouhou vzdálenost 301 a více km. Byla zjišťována úroveň úhynů pro brojlerů a kachny přepravované na jatky. Byly porovnávány relativní počty úhynů za celé sledované období mezi jednotlivými ročními obdobími a zjišťován vliv ročního období na úhyny při jejich přepravě na jatky. Byly porovnávány relativní počty úhynů za celé sledované období mezi jednotlivými přepravními vzdálenostmi a zjišťován vliv přepravní vzdálenosti na úhyny při jejich přepravě na jatky. Byly porovnávány relativní počty úhynů za celé sledované období pro jednotlivé kombinace ročních období a přepravních vzdáleností a bylo zjišťováno, která kombinace těchto dvou faktorů způsobuje nejvyšší úhyny u brojlerů kachen přepravovaných na jatky. Statistické posuzování vycházelo z porovnávání relativních četností pomocí c testu s určováním statistické významnosti na hladině $p \leq 0,05$. Výpočty byly provedeny pomocí programu Excel Microsoft Office Professional Plus 2019.

Výsledky a diskuse

Zabývali jsme se synergickým působením faktoru ročního období a faktoru přepravní vzdálenosti na počty uhynulé, utracené a přeražené drůbeže na nutnou porážku (dále jen úhyny) při přepravě na jatky, a to v členění na brojlerů (kur domácí) a kachny.

Brojleři

Počty přepravených brojlerů jsou uvedeny v tabulce č. 1 a počty uhynulých brojlerů (v %) jsou uvedeny v tabulce č. 2, a to pro jednotlivá roční období i za celý rok podle jednotlivých přepravních vzdáleností a celkově.

Tabulka č. 1

Počet přepravených brojlerů v jednotlivých ročních obdobích pro sledované přepravní vzdálenosti

přepraveno	přepravní vzdálenost					
období	< 50	100	200	300	>300	celkem
jaro	56632375	67890245	70341890	9892194	279851	205036555
léto	59827920	69371006	71937595	9140826	199424	210476771
podzim	57827963	69662193	68049072	8450891	224483	204214602
zima	52523334	62954952	63649630	8888130	130572	188146618
celkem	226811592	269878396	273978187	36372041	834330	807874546

Tabulka č. 2

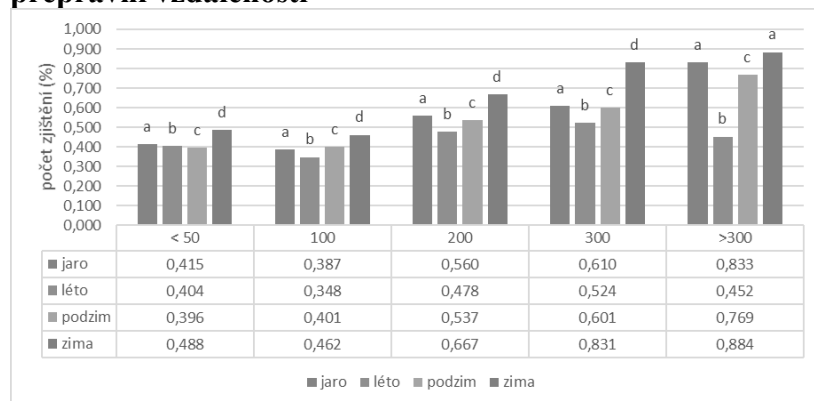
Počet uhynulých brojlerů v jednotlivých ročních obdobích pro sledované přepravní vzdálenosti

uhynulo (%)	přepravní vzdálenost					
období	< 50	100	200	300	>300	celkem
jaro	0,415	0,387	0,560	0,610	0,833	0,465
léto	0,404	0,348	0,478	0,524	0,452	0,416
podzim	0,396	0,401	0,537	0,601	0,769	0,454
zima	0,488	0,462	0,667	0,831	0,884	0,556
celkem	0,424	0,398	0,557	0,640	0,733	0,471

Synergické působení faktoru ročního období a faktoru přepravní vzdálenosti na počty uhynulých brojlerů při přepravě na jatky je uvedeno v grafu č. 1.

Graf č. 1

Porovnání počtu uhynulých brojlerů mezi jednotlivými ročními obdobími pro sledované přepravní vzdálenosti



Vysvětlivky : u sloupců rozdílná písmena vždy pro každou vzdálenost zvlášť označují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p \leq 0,05$, shodná písmena označují statisticky nevýznamný rozdíl na hladině významnosti $p > 0,05$.

Z grafu č. 1 vyplývá, že se projevilo synergické působení faktoru ročního období a faktoru přepravní vzdálenosti na počty uhynulých brojlerů při přepravě na jatky, kdy se ukázala jako nejhorší (nejvíce úhynů) kombinace zimního období (a případně jarního období) a nejdelší přepravní vzdálenosti (úhyn až 0,884% a případně 0,833%). Z výsledků je zřejmé, že synergie zimního období a dlouhé přepravní vzdálenosti je kombinace faktorů, která se negativně promítá do počtů úhynů brojlerů při přepravě na jatky.

Kachny

Počty přepravených kachen jsou uvedeny v tabulce č. 3 a počty uhynulých kachen (v %) jsou uvedeny v tabulce č. 4, a to pro jednotlivá roční období i za celý rok podle jednotlivých přepravních vzdáleností i celkově.

Tabulka č. 3

Počet přepravených kachen v jednotlivých ročních obdobích pro sledované přepravní vzdálenosti

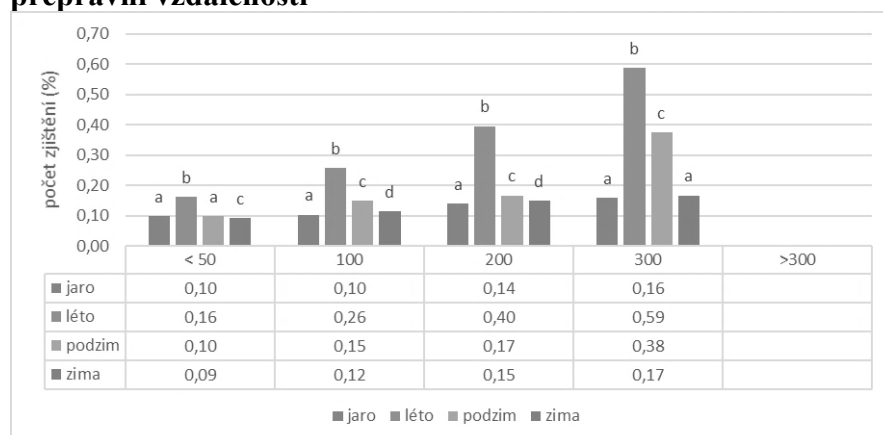
přepraveno	přepravní vzdálenost (km)					
období	< 50	100	200	300	>300	celkem
jaro	2562496	1568597	2583854	192075	0	6907022
léto	2363754	1562751	1770449	226278	0	5923232
podzim	2975290	1861592	2865886	305694	0	8008462
zima	2429008	1701022	2765922	277516	0	7173468
celkem	10330548	6693962	9986111	1001563	0	28012184

Tabulka č. 4

Počet uhynulých kachen v jednotlivých ročních obdobích pro sledované přepravní vzdálenosti

uhynulo (%)	přepravní vzdálenost (km)					
období	< 50	100	200	300	>300	celkem
jaro	0,100	0,104	0,140	0,159	-	0,118
léto	0,162	0,259	0,396	0,589	-	0,274
podzim	0,099	0,150	0,168	0,375	-	0,146
zima	0,094	0,116	0,150	0,168	-	0,124
celkem	0,113	0,156	0,196	0,324	-	0,160

Synergické působení faktoru ročního období a faktoru přepravní vzdálenosti na počty uhynulých kachen při přepravě na jatky je uvedeno v grafu č. 2.

Graf č. 2**Porovnání počtu uhynulých kachen mezi jednotlivými ročními obdobími pro sledované přepravní vzdálenosti**

Vysvětlivky: u sloupců rozdílná písmena vždy pro každou vzdálenost zvlášť označují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p \leq 0,05$, shodná písmena označují statisticky nevýznamný rozdíl na hladině významnosti $p > 0,05$.

Z grafu č. 2 vyplývá, že se projevilo synergické působení faktoru ročního období a faktoru přepravní vzdálenosti na počty uhynulých kachen při přepravě na jatky, kdy se ukázala jako nejhorší (nejvíce úhynů) kombinace letního období a nejdelší přepravní vzdálenosti (úhyn až 0,59%). Z výsledků je zřejmé, že synergie letního období a dlouhé přepravní vzdálenosti je kombinace faktorů, která se negativně promítá do počtů úhynů kachen při přepravě na jatky.

Závěr

Celkově lze konstatovat, že bylo prokázáno synergické působení faktoru ročního období a faktoru přepravní vzdálenosti na počty uhynulé drůbeže při přepravě na jatky, kdy u brojlerů byla zjištěna nejhorší kombinace zimního období a delší přepravní vzdálenosti ve smyslu nejvyšších úhynů a u kachen byla zjištěna nejhorší kombinace letního období a delší přepravní vzdálenosti ve smyslu nejvyšších úhynů.

Kontaktní adresa: Justová Eva, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42, Brno, justovae@vfu.cz

SEKCE 4

**Veřejné a soudní veterinářství
a toxikologie**

Vliv 17 α -ethinylestradiolu na životní funkce dania pruhovaného (*Danio rerio*)

Effect of 17 α -ethinylestradiol on vital functions of zebrafish (*Danio rerio*)

Pešková Nikola^{1,2}, Blahová Jana¹, Hollerová Aneta², Weiserova Zuzana¹, Hodkovicová Nikola², Maršálek Petr¹, Tichý František³, Franc Aleš⁴, Svobodová Zdeňka¹

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

²Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

³Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

⁴Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita

Summary

Pollution of the aquatic ecosystem by hormone-active substances is a frequently discussed topic these days. Such substances can pass through the sewage treatment plant system and affect aquatic life. This study tested the effect of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on individual zebrafish (*Danio rerio*) at an environmentally relevant concentration in fish food (10 μ g/kg) and at a concentration 100 times higher (1000 μ g/kg). This experiment revealed significant changes in the expression of reproductive genes, an increase in vitellogenin levels and histopathological lesions in the testes after EE2 exposure. Additionally, lipid peroxidation and changes in antioxidant enzyme activities were observed at both tested concentrations, along with morphological changes and increased mortality at the higher concentration. Even the environmentally relevant concentration of EE2 poses a danger to the aquatic organisms as it changes *D. rerio*'s reproductive and health parameters, indicating toxicity at the molecular, cell, tissue, and organism levels.

Keywords: 17 α -ethinylestradio; fish, gene expression; histopathology; oestrogens; oxidative stress

Úvod

Spotřeba léčiv celosvětově roste v důsledku stárnoucí populace v rozvinutých zemích a zlepšující se zdravotní péče v zemích rozvojových (Nasri et al., 2021). Konvenční čistírný odpadních vod však často nedokáže tyto látky zcela odstranit, což vede k výskytu farmaceutických reziduí, včetně estrogenů, ve vodním prostředí – ve splaškových, povrchových i pitných vodách (Ren et al., 2022). Zvláštní pozornost je věnována syntetickému estrogeneru 17 α -ethinylestradiolu (EE2), běžně používanému v antikoncepci. EE2 vykazuje vysokou perzistenci, nízkou rozpustnost a schopnost narušovat endokrinní systém organismů i v nízkých koncentracích (Adeel et al., 2017). Může ovlivnit reprodukci, vývoj, chování a rovnováhu organismu (Henriksen et al., 2016). U vodních živočichů, zejména ryb a mlžů, byly zaznamenány změny jako zvýšené hladiny vitellogeninu (VTG), intersexualita, snížená produkce pohlavních buněk, feminizace samců či oxidační stres (Brew et al., 2020; Weisserova et al., 2023). Tato studie se zaměřila na účinky perorální expozice EE2 na zdraví a reprodukci diploidních zebříček, s využitím dvou koncentrací ve stravě: 10 μ g/kg (environmentální) a 1000 μ g/kg (100 $\times$ vyšší). Hypotézou je, že i nízké koncentrace EE2 mohou ovlivnit pohlavní diferenciaci, mortalitu a fyziologické parametry ryb.

Materiál a metodika

Krmivo Gemma Micro 150 (Skretting, Norsko; 100–200 μ m) bylo obohaceno EE2 ($\geq$ 98 %, Sigma-Aldrich) ve dvou koncentracích: 10 μ g/kg (environmentálně relevantní) a 1 000 μ g/kg. Koncentrace EE2 byla ověřena chromatografií (LOD = 0,104 μ g/kg); výsledky: 10,7 $\pm$ 0,8 a 991,1 $\pm$ 59,6 μ g/kg. Experiment proběhl na Veterinární univerzitě v Brně. Po dvoutýdenní aklimatizaci následovala šestitýdenní expozice dle OECD 215 (OECD, 2000). Ryby (n = 192) byly rozděleny do 6 nádrží (2 kontrolní, 4 exponované) za identických podmínek (denní

výměna vody, fotoperioda 12:12 h, sledování O₂, pH, NH₃, NO₂). Po expozici byly ryby usmrčeny (MS-222, 250 mg/l, 10 min), odebrány morfometrické údaje a vzorky. Oxidační stres byl hodnocen metodou TBARS (Lushchak et al., 2005) a aktivitou enzymů GST, GR, GPx, CAT (Blahova et al., 2013). VTG byl stanoven metodou ELISA (Biosense, Norsko). Genová exprese markerů (např. *vtg1*, *cyp19a1a*, *star*) byla analyzována pomocí qRT-PCR (Hodkovicova et al., 2021). Gonády byly histologicky hodnoceny po fixaci ve formaldehydu a barvení HE (hematoxylin-eosinem). Statistická analýza byla provedena v Unistat for Excel 6.5 s hladinou významnosti $p < 0,05$. Všechny parametry byly testovány na normální rozdělení pomocí Shapiro-Wilkova testu a na homogenitu rozptylu pomocí jednofaktorové ANOVA následované post hoc Tukey-HSD testem. Pro vyhodnocení dat s nenormálním rozdělením byl zvolen neparametrický Kruskal-Wallisův test a Dunnův test. Analýza kategorických dat, jako je úmrtnost, byla provedena pomocí chí-kvadrát testu a kontingenčních tabulek.

Výsledky a diskuze

Během expozice došlo ve skupině s vysokou koncentrací EE2 k významnému zvýšení mortality (31,3 %, $p < 0,01$), zatímco v kontrolní skupině žádný úhyn nenastal. Ve skupině s nízkou dávkou uhynuli pouze dva jedinci. Po šesti týdnech bylo zaznamenáno výrazné snížení tělesné hmotnosti ($p < 0,01$) ve skupině s vysokou dávkou, zatímco celková délka těla byla významně zvýšena u obou exponovaných skupin ($p < 0,01$). Podobné výsledky uvádějí studie u jiných druhů ryb (Ye et al., 2018). Ve srovnání s triploidními zebříčkami (Weiserova et al., 2023) byla v našem pokusu mortalita diploidních jedinců vyšší, což může naznačovat jejich nižší odolnost vůči EE2. Analýza markerů oxidačního stresu ukázala významné zvýšení hladin TBARS a GPx a naopak pokles aktivity glutathionreduktázy (GR) po expozici EE2 ($p < 0,01$). Tyto změny signalizují oxidativní poškození buněk, pravděpodobně v důsledku narušené antioxidační obrany (Rodrigues et al., 2021; Weiserova et al., 2023). Hladina VTG, markeru endokrinní disrupce, byla významně zvýšena ve skupině s vysokou dávkou EE2 ($p < 0,01$). Indukce VTG u samců potvrzuje estrogení účinek EE2 a je v souladu s předchozími studiemi zaměřenými na účinky vodních i dietárních expozic (Weiserova et al., 2023). Což potvrzuje i histopatologická analýza testikulární tkáně, která po šesti týdnech expozice EE2 zaznamenala v nejvyšší koncentraci výrazné potlačení spermatogeneze se sníženým počtem spermií. Analýza genové exprese prokázala statisticky významný pokles exprese genů *cyp19a1a*, *hsd17b1*, *ptges1* a *star*, zatímco *vtg1* byla výrazně zvýšena ($p < 0,01$). Tyto změny ukazují na narušení hormonální regulace a biosyntézy steroidních hormonů při vysoké koncentraci EE2.

Závěr

Experiment naznačuje, že EE2 způsobil negativní změny na více úrovních. Na molekulární úrovni bylo ve srovnání s kontrolní skupinou ovlivněno několik genů spojených s reprodukčním systémem. To jasně korelovalo se zvýšenými hladinami markeru endokrinní disrupce – VTG a histopatologickými nálezy v testikulární tkáni exponovaných ryb. Při vyšší testované koncentraci byla pozorována významná úmrtnost (31,3 %). U samců ryb vystavených kontaminovanému prostředí může dojít ke změnám v reprodukčním systému, feminizaci a snížení populace. EE2 také představuje další riziko ovlivnění celkových zdravotních parametrů ryb, což vede k úhynu. Jelikož jsou ryby častou součástí lidské stravy, kontaminace vodního prostředí EE2 představuje potenciální riziko pro lidské zdraví. Proto by měly být estrogení látky z prostředí odstraněny.

Poděkování

Projekt byl financován z ERDF/ESF „Profish“ [č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869] a Ministerstvem zemědělství České republiky [RO 0523]. Tyto výsledky byly dále publikovány jako článek (Hollerova et al., 2025).

Literatura

NASRI, A.; MEZNI, A.; LAFON, P.A.; WAHBI, A.; CUBEDO, N.; CLAIR, P.; HARRATH, A.H.; BEYREM, H.; ROSSEL, M.; PERRIER, V. Ethinylestradiol (EE2) residues from birth control pills impair nervous system development and swimming behaviour of zebrafish larvae. *Science of the Total Environment*. 2021, vol. 770, s. 145272.

REN, Y.; ZHENG, J.; WANG, H. Transiently gene-modulated cell reporter for ultrasensitive detection of estrogen-like compounds in tap water. *Chemosphere*. 2022, vol. 289, s. 133161.

ADEEL, M.; SONG, X.; WANG, Y.; FRANCIS, D.; YANG, Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environment International*. 2017, vol. 99, s. 107–119.

HENRIKSEN, P.G.; BEEDHOLM, K.; BAATRUP, E. Differences in reproductive behaviour between spawning and non-spawning zebrafish pairs and the effects of 17 α -ethinylestradiol (EE2). *Toxics*. 2016, vol. 4, no. 3, s. 22.

BREW, D.W.; BLACK, M.C.; SANTOS, M.; RODGERS, J.; HENDERSON, W.M. Metabolomic investigations of the temporal effects of exposure to pharmaceuticals and personal care products and their mixture in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2020, vol. 39, s. 419–436.

WEISEROVA, Z.; BLAHOVA, J.; DOUBKOVA, V.; MARSALEK, P.; HODKOVICOVA, N.; LENZ, J.; TICHY, F.; FRANEK, R.; PSENICKA, M.; FRANC, A.; SVOBODOVA, Z. Does dietary exposure to 17 α -ethinylestradiol alter biomarkers related with endocrine disruption and oxidative stress in the adult triploid of *Danio rerio*? *Science of the Total Environment*. 2023, vol. 870, s. 161911.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V.; LUSHCHAK, O.V.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2005, vol. 37, s. 1319–1330.

BLAHOVA, J.; PLHALOVA, L.; HOSTOVSKY, M.; DIVISOVA, L.; DOBSÍKOVA, R.; MIKULIKOVA, I.; STEPANOVA, S.; SVOBODOVA, S. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, vol. 61, s. 82–85.

HODKOVICOVA, N.; HOLLEROVA, A.; CALOUDOVA, H.; BLAHOVA, J.; FRANC, A. et al. Do foodborne polyethylene microparticles affect the health of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)?. *Science of the Total Environment*. 2021, vol. 792, s. 148490.

HOLLEROVA, A.; PESKOVA, N.; WEISEROVA, Z.; HODKOVICOVÁ, N.; MARSALEK, P.; TICHY, F.; FRANC, A.; SVOBODOVÁ, Z.; BLAHOVA, J. Dietary exposure to 17 α -ethinylestradiol negatively affects reproduction and health parameters of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Fish Biology*. 2025.

YE, R.R.; PETERSON, D.R.; KITAMURA, S.I.; SEGNER, H.; SEEMANN, F.; AU, D.W.T. Sex-specific immunomodulatory action of the environmental estrogen 17 α -ethinylestradiol alongside with reproductive impairment in fish. *Aquatic Toxicology*. 2018, vol. 203, s. 95–106.

RODRIGUES, S.; SILVA, A.M.; ANTUNES, S.C. Assessment of 17 α -ethinylestradiol effects in *Daphnia magna*: life-history traits, biochemical and genotoxic parameters. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021, vol. 28, s. 23160–23173.

Kontaktní adresa: Pešková Nikola, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23442@vfu.cz

Vplyv spomaľovačov horenia na báze organických zlúčenín fosforu na embryonálny vývoj dania pruhovaného (*Danio rerio*)

The effects of phosphorus-based organophosphate flame retardants on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)

¹Michaela Frederika Vargová, ¹Kristína Lehocká, ¹Jana Cahová, ¹Lucie Plhalová,
¹Kamila Novotná Kružíková, ¹Nikola Pešková, ¹Přemysl Mikula

¹ Ústav ochrany a welfare zvierat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno, Česká republika

Summary

Organophosphate flame retardants (OPFRs) represent a group of chemicals widely used as replacements for brominated flame retardants. Due to their frequent release into the environment and documented toxic effects in aquatic organisms, it is essential to assess their potential impacts on aquatic life. The aim of this study was to evaluate the effects of two selected OPFRs – tris(1-chloro-2-propyl) phosphate (TCIPP) and triphenyl phosphate (TPhP) – on the embryonic development of the model organism zebrafish (*Danio rerio*). The test was conducted in accordance with OECD Guideline 236, assessing endpoints such as mortality, incidence of malformations, hatching, body length, and heart rate. The results showed that TCIPP did not exert significant effects on most evaluated parameters, except for a statistically significant increase in heart rate at a concentration of 100 µg/L ($p < 0.05$). In the case of TPhP, a significant increase in heart rate was also observed at 100 µg/L ($p < 0.05$), while at 1000 µg/L, a significant reduction in body length and increased incidence of malformations were recorded ($p < 0.01$). These findings highlight the potential cardiovascular and developmental toxicity of OPFRs in aquatic environments and underscore the need for further toxicological assessment.

Keywords: Flame retardants; Aquatic toxicity; Zebrafish embryos; Developmental effects

Úvod

Organofosforové spomaľovače horenia (OPFRs), ktoré sa bežne využívajú ako aditíva do nábytku, textílií, elektrospotrebičov či stavebných materiálov na zníženie ich horľavosti, predstavujú jedny z najčastejšie používaných spomaľovačov horenia (Hou et al. 2016). OPFRs sa stali alternatívou za bromované spomaľovače horenia (BFRs), ktoré boli v dôsledku ich perzistencie a bioakumulácie regulované ako perzistentné organické polutanty (POPs), (van der Veen and de Boer 2012). OPFRs sa zvyčajne pridávajú do materiálov ako prísady a nie prostredníctvom chemickej väzby, čo ich robí náchylnejšími na vstup do životného prostredia opotrebovaním, odparovaním a penetráciou (Luo et al. 2024). Nízka účinnosť odstraňovania organofosfátových spomaľovačov horenia (OPFRs) v čistiarňach odpadových vôd prispieva k ich širokému výskytu v rôznych environmentálnych zložkách. Medzi najčastejšie identifikované OPFRs v životnom prostredí patrí tris(1-chlór-2-propyl)fosfát (TCIPP) a trifenyfosfát (TPhP). Tieto látky vykazujú odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti, čo ovplyvňuje ich správanie a biologickú dostupnosť vo vodných systémoch (Hou et al., 2016). Predchádzajúce štúdie poukazujú na schopnosť OPFRs narúšať embryonálny vývoj rýb, ovplyvňovať morfológický vývoj, srdcovú frekvenciu, liahnutie a prežitie embryí (Dishaw et al. 2014; Zhang et al. 2023).

Cieľom našej práce bolo posúdiť akútnu toxicitu vybraných spomaľovačov horenia na báze orgánofosfátov (TCIPP a TPhP) na ranné vývojové štádiá dania pruhovaného (*Danio rerio*) najmä na vývoj embryí, mortalitu, liahnutie, výskyt malformácií, srdcovú frekvenciu a dĺžku tela.

Materiál a metódy

Embryonálne testy boli vykonané s využitím modifikovanej metódy OECD 236 (Fish embryo acute toxicity (FET) test). Ako modelový druh bolo zvolené danielo pruhovalé (*Danio rerio*), tento zástupca patrí medzi často využívané modelové organizmy v toxikologických testoch, v ktorých sú zisťované negatívne účinky cudzorodých látok vyskytujúcich sa vo vodnom prostredí. Do testu boli nasadené čerstvo oplodnené ikry vo veku do 1,5 hodiny po oplodnení. Embryá boli umiestnené do 24-jamkových mikrotitračných doštičiek a počas 96 hodín boli vystavené pôsobeniu látok – trifenylofosfát (TPhP) a tris(1-chlór-2-propyl)fosfát (TCIPP). Uvedené spomaľovače horenia boli testované samostatne, pričom pre obe látky – TCIPP a TPhP – boli použité rovnaké vybrané koncentrácie (0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/L) V každom teste bola tiež kontrolná skupina, ktorá bola vystavená iba riediacej vode bez prídavku testovanej látky. Riedená voda bola pripravená podľa normy ISO 7346 (1996). V teste bola zahrnutá aj kontrolná skupina s rozpúšťadlom, konkrétne dimetylsulfoxidom (DMSO), použitým v maximálnej schválenej koncentrácii 0,01 % podľa smernice OECD 236. Testované roztoky boli pravidelne obmieňané po 24 hodinách. Pozorovanie prebiehalo celkom 96 hodín, pričom každých 24 hodín bolo vykonávané hodnotenie mortality, liahnutia a možného výskytu malformácií (napr. deformácia tela, zmeny pigmentácie, edém srdca, edém žltkového vaku). Ďalej bola sledovaná tepová frekvencia, a to v čase 48 hodín po oplodnení (hpf). V priebehu testu boli embryá umiestnené v rastovej komore za konštantných podmienok (26 ± 1 °C, fotoperiód 12 h svetlo/12 h). Na štatistické spracovanie dát bol využitý softvér Unistat 6.5. pre Excel. Rozdiely v mortalite, v liahnutí a vo výskyte prípadných morfológických zmien boli testované iba medzi kontrolnou skupinou a jednotlivými pokusnými skupinami s využitím kontingenčných tabuliek 2x2. Pre zistenie štatisticky významných rozdielov medzi hodnotami srdcového tepu a dĺžky tela bolo najskôr vykonané testovanie normality (Shapiro-Wilkov test). Vzhľadom na to, že nebola splnená podmienka normality, bol následne využitý neparametrický viacvýberový mediánový test. Porovnávané boli vždy experimentálne skupiny voči kontrolnej skupine v danom čase pozorovania. Štatistická významnosť bola hodnotená na hladine $p < 0,05$ ako štatisticky významná, $p < 0,01$ ako štatisticky vysoko významná a $p > 0,05$ štatisticky nevýznamná.

Výsledky a diskusia

Po štatistickom vyhodnotení nebol zistený signifikantný vplyv TCIPP na mortalitu, výskyt malformácií, liahnutie ani dĺžku tela embryí danielo pruhovalého v porovnaní s kontrolnou skupinou. Avšak pri koncentrácii 100 µg/L bol zaznamenaný štatisticky významný nárast srdcovej frekvencie ($p < 0,05$). Tieto zistenia naznačujú, že TCIPP môže ovplyvniť kardiovaskulárnu aktivitu embryí aj pri koncentráciách, ktoré nevyvolávajú morfológické zmeny ani zvýšenú mortalitu. Na rozdiel od toho Du et al. (2015) pozorovali zníženie srdcovej frekvencie u embryí zebrafish vystavených TCIPP, čo môže súvisieť s rozdielmi v experimentálnom dizajne, použitých rozpúšťadlách alebo citlivosti hodnotenia. Tieto rozdiely poukazujú na komplexnosť účinku TCIPP na srdcovú činnosť, ktorá môže byť ovplyvnená viacerými faktormi.

Po štatistickom vyhodnotení nebol zaznamenaný signifikantný vplyv TPhP na mortalitu ani liahnutie v porovnaní s kontrolnou skupinou. Pri koncentrácii 100 µg/L však bol zaznamenaný štatisticky významný nárast srdcovej frekvencie ($p < 0,05$) oproti kontrole. Pri koncentrácii 1000 µg/L bol pozorovaný štatisticky vysoko významný vplyv ($p < 0,01$) na skrátenie dĺžky tela, ako aj zvýšený výskyt malformácií – štatisticky významný pri 48 hpf (hodín po oplodnení), ($p < 0,05$) a štatisticky vysoko významný pri 72 a 96 hpf ($p < 0,01$). Tieto výsledky sú v súlade so štúdiou Isales et al. (2015), ktorá preukázala zmeny v morfológii a funkcii srdca vrátane

zváženia perikardiálnej oblasti a zníženia telesnej dĺžky u embryí vystavených TPhP. Rovnako Mitchell et al. (2018) naznačili, že TPhP môže ovplyvniť vývoj srdca prostredníctvom narušenia signálnych dráh jadrových receptorov, čo môže viesť k zmenám v expresii génov dôležitých pre vývoj kardiovaskulárneho systému.

Záver

Výsledky tejto štúdie poukazujú na rozdielne účinky TCIPP a TPhP na embryonálny vývoj diania pruhovaného. Zatiaľ čo TCIPP nevykazoval signifikantný vplyv na mortalitu, morfológické abnormality, liahnutie ani dĺžku tela, pozorovaný bol štatisticky významný účinok na srdcovú frekvenciu pri vyššej testovanej koncentrácii (100 µg/L). Naopak, TPhP preukázal výraznejší toxikologický profil – pri koncentrácii 100 µg/L ovplyvnil srdcovú frekvenciu a pri 1000 µg/L mal signifikantný negatívny dopad na dĺžku tela a výskyt malformácií v rôznych štádiách vývoja. Tieto výsledky naznačujú, že niektoré OPFRs môžu spôsobovať subletálne, ale biologicky významné zmeny už pri nízkych koncentráciách, čo vyvoláva obavy z ich vplyvu na vodné organizmy. Výsledky zároveň podporujú potrebu ďalšieho výskumu zameraného na mechanizmy toxicity OPFRs, ako aj ich potenciálne dlhodobé ekologické dopady.

Literatúra

DISHAW, L. V.; HUNTER, D. L.; PADNOS, B.; PADILLA, S.; STAPLETON, H. M. Developmental exposure to organophosphate flame retardants elicits overt toxicity and alters behavior in early life stage zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences*. 2014, vol. 142, no. 2, s. 445–54.

DU, Z.; WANG, G.; GAO, S.; WANG, Z. Aryl organophosphate flame retardants induced cardiotoxicity during zebrafish embryogenesis: By disturbing expression of the transcriptional regulators. *Aquatic Toxicology*. 2015, vol. 161, s. 25–32.

HOU, R.; XU, Y.; WANG, Z. Review of OPFRs in animals and humans: Absorption, bioaccumulation, metabolism, and internal exposure research. *Chemosphere*. 2016. vol. 153, s. 78–90.

ISALES, G. M.; HIPSZER, R. A.; RAFTERY, T. D.; CHEN, A.; STAPLETON, H. M.; VOLZ, D. Triphenyl phosphate-induced developmental toxicity in zebrafish: Potential role of the retinoic acid receptor. *Aquatic Toxicology*. 2015, vol. 161, s. 221–230.

LUO, S.; ZHANG, Q.; ZHENG, S.; WANG, D.; HUANG, W.; HUANG, Y.; SHI, X.; XIE, H.; WU, K. Visual toxicity in zebrafish larvae following exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), triphenyl phosphate (TPhP), and isopropyl phenyl diphenyl phosphate (IPPP). *Science of the Total Environment*. 2024, vol. 950, s. 75131.

MITCHELL, C. A.; DASGUPTA, S.; ZHANG, S.; STAPLETON, H. M.; VOLZ, D. Disruption of nuclear receptor signaling alters triphenyl phosphate-induced cardiotoxicity in zebrafish embryos. *Toxicological Sciences*. 2018. vol. 163, no.1, s. 307-318.

OECD. Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. 2013.

VAN DER VEEN, I.; DE BOER, J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere*. 2012. vol. 88, no. 10, s. 1119-1153.

ZHANG, Q.; ZHENG, S.; SHI, X.; LUO, C.; HUANG, W.; LIN, H.; PENG, J.; TAN, W.; WU, K. Neurodevelopmental toxicity of organophosphate flame retardant triphenyl phosphate (TPhP) on zebrafish (*Danio rerio*) at different life stages. *Environment International*. 2023 vol. 172, s. 107745.

Kontaktná adresa: Michaela Frederika Vargová, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvierat a verejného veterinárneho lekárstva, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23443@vfu.cz

Effect of fluconazole and its metabolite 1,2,4 - triazole on the early developmental stages of the African clawed frog (*Xenopus laevis*)

¹Riesova Barbora, ¹Hesova Renata, ¹Blahova Jana, ¹Koriakina Ekatarina, ¹Vargova Michaela, ²Agostini Maia Lorena, ²Harnos Jakub, ¹Lakdawala Pavla

1 University of Veterinary Sciences Brno, Department of Animal Protection and Welfare & Veterinary Public Health, Palackého tr. 1946/1, Brno, Czech Republic

2 Masaryk University, Department of Experimental Biology, Kamenice 753/5, Brno, Czech Republic

Summary

This study investigated the developmental toxicity of fluconazole and 1,2,4-triazole on *Xenopus laevis* embryos using the FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus*) protocol. Embryos were exposed to three concentrations (1, 100, and 1000 µg/L) of each compound for the period of 120 hours. No significant mortality or delay in hatching was observed; however, FLU exposure led to a concentration-dependent increase in malformations, elevated heart rate, and increased body length, indicating higher developmental toxicity. TRIAZ showed significantly lower toxicity, with minimal effects observed only at the highest concentration. These findings highlight the environmental risks posed by pharmaceutical and pesticide residues, particularly azole compounds, to non-target aquatic organisms.

Keywords: drugs; toxicity; aquatic organism; acute test

Introduction

Each year, substantial quantities of pharmacologically active substances are employed worldwide to treat diseases and protect public health (Akay and Kayan, 2021). Among these, antifungal agents are widely used not only in human and veterinary medicine. These compounds can enter aquatic environments through various pathways, including effluent from wastewater treatment plants, industrial discharges, aquaculture operations, and agricultural runoff (Monapathi et al., 2021). Azole compounds such as fluconazole (FLU), due to their specific mode of action, have the potential to interfere with endocrine systems in non-target organisms, thereby posing significant environmental risks (Kahle et al., 2008).

Materials and methods

A study was led by FETAX metrology with freshly fertilized eggs of *X. laevis*. Fertilized eggs were carefully selected using a Pasteur pipette under a stereomicroscope and subsequently divided into 24-well microtiter plates. FLU and its degradation product 1,2,4-triazole (TRIAZ) were tested in 3 concentrations (1; 100 and 1000 µg/L). A control concentration was also set using 0.01 % diluted solution of Modified Marc's Ringer (MMR). Tested embryos were exposed to test substance solutions until they reached developmental stage no 45 according to Nieuwkoop and Faber (1994) at a constant temperature of 21°C. Mortality, hatching rate, presence of developmental malformations and other lethal or sublethal effects were monitored daily.

Results and discussion

Mortality, hatching, malformation, heartbeat and body length

In our study, no significant mortality was observed in embryos exposed to either FLU or TRIAZ. Hatching was recorded at 72 hours post fertilization (hpf), with all embryos successfully hatched by this time point at all FLU and TRIAZ solutions. A statistically significant increase in malformation occurrence was observed at 96 hpf in embryos exposed to 1 µg/L FLU ($p < 0.01$). By 120 hpf, all tested concentrations of FLU resulted in a significant

increase in malformation rates compared to the control group ($p < 0.001$). In our study we recorded malformation like heart edema, smaller head, intestine deformation and higher pigmentation (Fig. 1). Additionally, exposure to 1000 $\mu\text{g/L}$ FLU resulted in significantly increased heartbeat rate compared to the control group ($p < 0.001$) and 100 $\mu\text{g/L}$ FLU ($p < 0.05$). In our study we observed a statistically significant ($p < 0.05$) longer body in 1000 $\mu\text{g/L}$ FLU. Regarding the results published in other scientific studies, Bhagat et al. (2021) observed a lower hatching rate at 72 hpf in embryos of *Danio rerio* exposed to 1000 $\mu\text{g/L}$ FLU and Wu et al. (2025) described a significant decrease ($p < 0.001$) in the heartbeat rate of *D. rerio* exposed to 800 000 $\mu\text{g/L}$ FLU. Additionally, embryos exposed to the same concentration exhibited significantly longer body length ($p < 0.05$). Even though in comparison with FLU exhibited TRIAZ overall lower toxicity, several negative effects were observed. Among them, a statistically significant increase in malformations was reported at 100 $\mu\text{g/L}$ TRIAZ at 120 hpf ($p < 0.05$). Compared to FLU, exposure to TRIAZ resulted in significantly faster heartbeat at the concentration of 100 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.05$). TRIAZ had no significant effect on body length.



Figure. 1: Embryo of *X. laevis* in control (on the left), and embryo of *X. laevis* exposed to 1000 $\mu\text{g/L}$ FLU (on the right)

Conclusion

Our study aimed to widen the current knowledge of acute toxicity of FLU and TRIAZ on early-life stages of amphibians using *X. laevis* as a model organism. The effects were observed using a wide range of lethal endpoints. FLU showed higher developmental toxicity in *X. laevis* embryos compared to its degradation product TRIAZ. Exposure to FLU resulted in significant malformation occurrence, increased heartbeat rate, and increased body length at higher concentrations. In contrast, TRIAZ induced fewer malformations and had minimal effects on growth and physiology, indicating lower overall toxicity. The results of this study emphasize the need for greater attention to the potential adverse effects of pharmaceutical and pesticide residues on non-target species in the environment.

Acknowledgements

This study was financially supported by project IGA VETUNI 218/2024/FVHE.

Literature

AKAY, S., KAYAN, B. Aqueous solubility and chromatographic studies of antifungal drug-fluconazole at high temperature conditions. *Journal of Molecular Liquids*. 2021. 328: 115438.

BHAGAT, J., ZANG, L., NAKAYAMA, H., NISHIMURA, N., SHIMADA, Y. Effects of nanoplastic on toxicity of azole fungicides (ketoconazole and fluconazole) in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*. 2021. 800: 149463.

KAHLE, M., BUERGE, I. J., HAUSER, A., MÜLLER, M. D., POIGER, T. Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. *Environmental Science & Technology*. 2008. 42: 19.

MONAPATHI, M. E., OGUEGBULU, J. C., ADOGO, L., KLINK, M., OKOLI, B., MTUNZI, F., MODISE, J. S., Pharmaceutical Pollution: Azole Antifungal Drugs and Resistance of Opportunistic Pathogenic Yeasts in Wastewater and Environmental Water. *Applied and Environmental Soil Science*, 2021. 9985398: 11.

NIEUWKOOP, P. D., FABER, J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York. 1994. ISBN 0-8153-1896-0.

WU, H., ZHAO, G., FENG, W., YANG, CH., JIANG, Y. Fluconazole induces cardiovascular toxicity in zebrafish by promoting oxidative stress, apoptosis, and disruption of key developmental genes. *Chemico-Biological Interactions*. 2025. 408: 111391.

Contact adress: Barbora Riesová, Mgr., Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, FVHE VETUNI, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, H22343@vfu.cz

SEKCE 5

Veterinární ekologie a choroby volně žijících zvířat

Morfometrická analýza luptoušů (Phthiraptera: Amblycera) rodu *Trochiliphagus* a *Trochiloecetes* u kolibříků

Morphometric analysis of lice (Phthiraptera: Amblycera) of the genera *Trochiliphagus* and *Trochiloecetes* in hummingbirds

¹Schmiedová Annabella Maria, ¹Sychra Oldřich, ²Čapek Miroslav, ¹Literák Ivan

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE, VETUNI, Brno

²Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., Brno

Summary

Hummingbirds (*Trochilidae*), with 366 described species, represent one of the most diverse avian families, yet their parasitic louse fauna remains poorly known. Only 50 louse species from four genera of the suborder Amblycera have been described, mostly from a limited number of hosts. Among these, the genera *Trochiliphagus* and *Trochiloecetes* (*Ricinidae*) are particularly problematic due to their unclear taxonomy, morphological similarity and lack of molecular data. Both genera differ in body shape and microhabitat preference on the host. In this study, a total of 711 specimens from museum collections were analyzed using morphometric and multivariate methods. Preliminary results indicate that species diversity in *Trochiliphagus* may be overestimated, and its taxonomic independence remains uncertain. Multivariate analyses of *Trochiloecetes* are ongoing.

Keywords: *Trochilidae*; taxonomy; morphology; clustering

Úvod

Kolibříci patří s 366 popsanými druhy k nejpočetnějším skupinám ptáků (Gill et al., 2023). I přes velký počet druhů bylo dosud popsáno pouze 50 druhů všenek čtyř rodů z podřádu luptoušů (Amblycera): *Leremenopon* (4 druhy), *Myrsidea* (3), *Trochiloecetes* (30) a *Trochiliphagus* (13), u 37 druhů kolibříků (10 %) (Dalglish and Price, 2003a, 2003b). Na rozdíl od prvních dvou rodů jsou druhy rodů *Trochiliphagus* a *Trochiloecetes* velmi špatně popsány a někteří autoři zpochybňují jejich platnost. Většina druhů je popsána podle jediné samice či samce, takže nelze adekvátně hodnotit jak vnitrodruhovou variabilitu, tak hostitelskou specifitu těchto rodů. Oba rody zahrnují velké hematofágní druhy, což je v rámci všenek výjimečné a může mít významný vliv na jejich hostitele (Carriker, 1960). Ekologické studie ukazují koexistenci obou rodů na jednom hostiteli (Oniki-Willis et al., 2023), přičemž *Trochiloecetes* (robustní, s větší hlavou) se vyskytuje na hlavě a krku hostitele, zatímco štíhlejší *Trochiliphagus* na hrudníku. Přes zjevné morfologické rozdíly zůstává jejich taxonomické zařazení částečně nevyjasněné – především kvůli absenci molekulárních dat a možnému parafyletickému postavení uvnitř čeledi Ricinidae.

Cílem této práce je revize morfometrické variability zástupců obou rodů na základě rozsáhlého souboru exemplářů z muzejních sbírek. Analýza zahrnuje měření tělesných rozměrů, hodnocení morfologických znaků a statistické zpracování dat s cílem ověřit míru druhové diverzity.

Materiál

Materiál použitý v této studii tvořily trvalé mikroskopické preparáty všenek pocházející především ze sbírek významných světových muzeí a dále materiál získaný během výzkumných aktivit pracovníků Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat Veterinární univerzity Brno ve Střední a Jižní Americe. Největší a nejcennější část představuje sbírka všenek uložená v National Museum of Natural History (Smithsonian Institution, Washington, D.C.), která zahrnuje také typový materiál – holotypy, allotypy a paratypy. Celkem bylo analyzováno

191 jedinců všenek rodu *Trochiliphagus* a 520 jedinců rodu *Trochiloecetes*. Vzorky zahrnovaly jak dospělé samce a samice, tak larvální stádia.

Metodika

Byla provedena metrická analýza zahrnující měření 8-10 tělesných rozměrů (v závislosti na rodu a pohlaví) jednotlivých jedinců. Měření probíhala pod světelným mikroskopem za použití softwaru Quick Photo. U rodu *Trochiliphagus* bylo navíc hodnoceno 143 morfometrických znaků původně stanovených pro rod *Ricinus*. Tato sada byla částečně modifikována s ohledem na morfologické odlišnosti rodu a bylo možné využít 92,3 % znaků. Nepoužitelnost zbývajících znaků souvisela s morfologickými rozdíly nebo horší kvalitou preparátů. Pro hodnocení morfometrické variability byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) v programech Syntax 2000 (modul Ordin) a RStudio. Pro rod *Trochiliphagus* byly v RStudio dále provedeny navazující analýzy, včetně shlukování pomocí k-means clusteringu a diskriminační analýzy (LDA).

Výsledky

PCA analýza odhalila výraznou morfologickou variabilitu u rodu *Trochiliphagus*, zejména mezi vývojovými stádii a pohlavími. První komponenta (PC1) zachycovala velikostní rozdíly, zatímco druhá komponenta (PC2) reflektovala variace v hlavových znacích. U dospělých samců hrála roli i délka pohlavního aparátu, která nebyla korelována s tělesnou velikostí. Jedinci se rozdělovali do tří hlavních shluků, což bylo potvrzeno metodou k-means a diskriminační analýzou (LDA). Jednotlivé shluky byly označeny podle dominantního druhu jako morfotyp *abdominalis*, *latitemporalis* a *hirsutus*. PCA analýza u rodu *Trochiloecetes* ukázala vysokou morfologickou homogenitu mezi jedinci. První hlavní komponenta (PC1) reflektovala především celkovou velikost, zatímco druhá komponenta (PC2) zachycovala variace v předních tělních znacích. Jedinci se seskupovali do úzkého morfologického prostoru bez zřetelného členění. U dospělých samců silně korelovala délka pohlavního aparátu s celkovou velikostí těla.

Vzhledem k rozsahu (143 znaků) uvádím pouze výběr morfologických znaků s vyšší variabilitou. U hlavy byly rozlišeny čtyři typy tvaru. Prothorax měl dva základní tvary. U samců nebyly pozorovány morfologické rozdíly pohlavního aparátu, zatímco u samic se výrazně lišil počet štětín na vulvě (14–36).

Diskuze

Tradičně byly druhy obou rodů považovány za striktně hostitelsky specifické (Price et al., 2003). Rheinwald (2007) však navrhl, že všech třináct popsaných druhů rodu *Trochiliphagus* představuje ve skutečnosti jediný druh, a celý rod dokonce synonymizoval s rodem *Ricinus*, jehož zástupci jsou hostitelští generalisté. Carrikerův (1960) určovací klíč, založený výhradně na celkové velikosti všenek a jejich rozdělení do tří velikostních skupin, je dnes již nevyhovující. Opomíjí například Harrisonovo pravidlo o korelaci velikosti parazita a hostitele.

Pro spolehlivou druhovou determinaci je proto nutné doplnit analýzu o další rozměry a morfologické znaky. V této studii jsem za tímto účelem převzala určovací klíč vytvořený Valanem (2018) pro rod *Ricinus* a aplikovala jej na rod *Trochiliphagus*. Metodika d-korelace (Podani et al., 2023), použitá například ve studii Sychra et al. (2024), se jeví jako vhodný přístup pro zpracování morfologických znaků, neboť umožňuje kombinovat proměnné různých měřítek a následně aplikovat ordinační metody jako PCA k vyhodnocení mezidruhových rozdílů.

Závěr

Tato studie představuje ucelený základní přehled morfometrické analýzy všenek rodů *Trochiliphagus* a *Trochiloecetes*, parazitujících na kolibřících. Předběžné výsledky naznačují, že skutečná druhová diverzita v rámci rodu *Trochiliphagus* může být nižší než současně uznávaný počet 13 druhů. Na základě PCA analýzy metrických rozměrů byla identifikována možná přítomnost tří morfotypů (potenciálně tří druhů) tohoto rodu. Analýza odhalila jak řadu znaků vykazujících vysokou míru morfologické variability, tak znaky, které zůstávají napříč jedinci stabilní. Některé proměnlivé znaky, zejména v oblasti hlavy, prothoraxu a samičí vulvy, mohou mít potenciální taxonomický význam, který je však potřeba dále ověřit. Pro přesnější určení druhové diverzity a systematického postavení zkoumaných rodů bude nezbytné provést molekulární analýzy. Tyto analýzy tvoří navazující fázi výzkumu, který se zaměří také podrobněji na rod *Trochiloecetes*.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem 2025ITA23 VETUNI Brno.

Literatura

- CARRIKER, M.A., 1960. Studies in Neotropical Mallophaga, XVII: a new family (*Trochiliphagidae*) and a new genus of the lice of hummingbirds. *Proceedings of the United States National Museum*, 112, 307–342.
- DALGLEISH, R.C. and PRICE, R.D., 2003a. A new genus and four new species of chewing lice (Phthiraptera: Amblycera: Menoponidae) from hummingbirds (Apodiformes: Trochilidae). *Occasional Papers of the Western Foundation of Vertebrate Zoology*, 7, 1–9.
- DALGLEISH, R.C. and PRICE, R.D., 2003b. Two new species of *Myrsidea* (Phthiraptera: Amblycera: Menoponidae) from hummingbirds (Apodiformes: Trochilidae). *Occasional Papers of the Western Foundation of Vertebrate Zoology*, 6, 1–9.
- GILL, F., DONSKER, D. and RASMUSSEN, P. (eds.), 2023. *IOC World Bird List (v13.2)* [online]. doi:10.14344/IOC.ML.13.2 [accessed 6 May 2025]. Available from: <https://doi.org/10.14344/IOC.ML.13.2>
- ONIKI-WILLIS, Y., WILLIS, E.O., LOPES, L.E. and RÓZSA, L., 2023. Museum-based research on the lice (Insecta: Phthiraptera) infestations of hummingbirds (Aves: Trochilidae) – prevalence, genus richness and parasite associations. *Diversity*, 15, 54. doi:10.3390/d15010054
- PODANI, J., SCHMERA, D. and BAGELLA, S., 2023. Correlating variables with different scale types: a new framework based on matrix comparisons. *Methods in Ecology and Evolution*, 14, 1049–1060.
- PRICE, R.D., HELLENTHAL, R.A. and PALMA, R.L., 2003. World checklist of chewing lice with host associations and keys to families and genera. In: PRICE, R.D., HELLENTHAL, R.A., PALMA, R.L., JOHNSON, K.P. and CLAYTON, D.H. (eds.). *The Chewing Lice: World Checklist and Biological Overview*. Champaign, IL: Illinois Natural History Survey, Special Publication 24, pp. 1–448.
- RHEINWALD, G., 2007. The position of *Trochiliphagus* Carriker within the *Ricinidae* (Insecta: Phthiraptera). *Bonner Zoologische Beiträge*, 55, 37–46.
- SYCHRA, O., RÓZSA, L., PODANI, J., SYCHRA, V., LITERÁK, I. and ČAPEK, M., 2024. Multivariate study of lice (Insecta: Psocodea: Phthiraptera) assemblages hosted by hummingbirds (Aves: Trochilidae). *Parasitology*, 151, 191–199. doi:10.1017/S0031182023001294
- VALAN, M., 2018. *Chewing lice of hummingbirds and wildliving birds*. Dissertation thesis. Brno: University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Biology and Wildlife Diseases.

Kontaktní adresa: Annabella Maria Schmiedová, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, h23436@vfu.cz

Prevalence filariální infekce v krvi a ektoparazitech netopýrů

Prevalence of filarial infection in bat blood and ectoparasites

Vévodová Veronika, Němcová Monika, Bednaříková Šárka, Pikula Jiří

Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Summary

*This study examines the occurrence and prevalence of filarial nematodes in bats across Europe and Asia, with a particular focus on identifying potential vectors. Despite the ecological significance of these host-parasite interactions, this area remains largely unexplored. Filariae, primarily of the genus *Litomosa*, were detected in bat blood samples and associated ectoparasites, like mites, ticks and fleas. Filarial DNA was found in 8,8 % of bat blood samples and 5 % of ectoparasite samples. Several novel filarial species were identified, and their presence was confirmed in different bat species. These findings enhance our understanding of the filarial life cycle, host-vector relationships, and potential impacts on bat health and broader ecological dynamics.*

Keywords: Nematoda; Chiroptera; *Litomosa* sp.; ectoparasites; nested PCR

Úvod

Netopýři jsou hostitelé široké škály virových, bakteriálních a mykotických patogenních agens, která jsou sledována s ohledem na jejich vysokou infekčnost, mortalitu nových hostitelů či potenciální riziko zoonóz. Filárie a jejich výskyt u netopýrů zatím nejsou důkladně prozkoumány. Do dnešní doby se však podařilo u různých druhů netopýrů identifikovat různé druhy filárií, zejména z rodu *Litomosa* spp., například na území Mexika nebo Madagaskaru (Ramasingh et al., 2016; Rendón-Franco et al., 2019), případně jiných zaoceánských zemí. Díky těmto objevům se nám rozšiřují znalosti o jejich životním cyklu, interakci s hostiteli a dopadu na zdraví hostitele. Z území Evropy a Asie však existuje jen velmi malý vzorek záchytu těchto endoparazitů (Mészáros and Mas-Coma, 1980; Horvat et al., 2016), stále tak chybí ucelený přehled o jejich prevalenci u netopýrů na tomto území, což je hlavním cílem této studie.

Filárie osidlují především peritoneální dutinu, ale také mozek či srdeční komory a ovlivňují tak zdravotní stav a chování jejich hostitelů (Morand et al., 2006). Mezi zaznamenané klinické příznaky patří například slabost a respirační potíže a následné histopatologické nálezy na orgánech. Ne vždy se musí u všech jedinců určité klinické příznaky objevit (Rendón-Franco et al., 2019). Larvální formy mikrofilárií, byly zaznamenány také ve spermatu netopýrů, mohou tak ovlivnit jeho kvalitu a tím také ohrozit reprodukční úspěšnost netopýrů (Pikula et al., 2023).

Hlavní metoda pro záchyt filárií je detekce v krevním nátěru. V případě pozitivního nálezu jsou zvířata většinou usmrcena pro získání dospělých červů z tkání, aby mohli být pomocí morfologie druhově identifikováni. V této studii však byly druhy filárií zkoumány na základě pouze neletálně odebraných vzorků krve a neinvazivně odebraných vzorků krevsajících ektoparazitů netopýrů, kteří mají nejzásadnější roli v přenosu infekčních larválních stádií (infekční larva L3) z jednoho hostitele na druhého. Detekce mikrofilariální DNA v ektoparazitech tudíž může odrážet jejich přítomnost v krvi hostitelů, či přítomnost dospělých filárií v jejich tkáních. V naší studii je většina vzorků odebrána párově – tedy krev i ektoparazit z jednoho jedince. Z dostupných zdrojů pouze několik publikací sledovalo výskyt mikrofilárií v krevsajících ektoparazitech nebo identifikovalo ektoparazity jako kompetentní vektory filárií u netopýrů (Bain et al., 2002). Netopýři jsou přitom hostiteli široké škály těchto potenciálních vektorů, jako jsou roztoči, klíšťata, muchule nebo blechy. Zejména samice s mláďaty na letních

koloniích jsou ektoparazity silně zatíženy, což podporuje potenciální přenos tzv. „vector-borne“ nemocí, včetně právě filarióz.

Cílem tedy bylo získat informace o prevalenci a diverzitě filárií u netopýřů na eurasijském kontinentu a identifikovat potenciální vektory podílející se na přenosu mikrofilárií mezi hostiteli a zjistit druhovou příslušnost filárií pomocí sekvenace získané DNA.

Materiál a metodika

Analýze byla podrobena kolekce 262 vzorků krve a 564 vzorků krevsajících ektoparazitů z 24 druhů netopýřů (*Rhinolophus ferrumequinum*, *Miniopterus schreibersii*, a další). Vzorky pocházely z oblastí České republiky, Bulharska, Arménie, Gruzie, Slovenska a Ruska. Ektoparaziti byli morfologicky určeni a uchovávaní ve zkumavkách se 70% etanolem až do následné analýzy. Ze vzorků ektoparazitů byla izolována DNA pomocí kitu NucleoSpin® TISSUE XS dle upraveného protokolu pro co nejvyšší výtěžnost DNA. Z krve byla DNA izolována pomocí kitu NucleoSpin® BLOOD (Macherey-Nagel, Německo). Koncentrace a kvalita získané DNA byla ověřena pomocí nano-spektrofotometru. Izolát DNA byl následně skladován při teplotě -20 °C.

Izolovaná DNA byla podrobena analýze pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). V tomto případě jsme použili vlastní metodu nested PCR pro detekci filárií (gen COX 1), vzniklou modifikací Casiraghi et al. (2021), která se vyznačuje vyšší citlivostí a specifíčností. V prvním kole byly použity primery CF F3 (TTCTGTTTTDACTATRCATGG) a CF R5 (GCHACAACATAATAAGTATCATG), (934 bp). Ve druhém kole pak COI int F (TGATTGGTGGTTTTGGTAA) a COI int R (ATAAGTACGAGTATCAATATC), (689 bp). Reakční směs pro první kolo o objemu 20 µl obsahovala 10 µl Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 6 µl H₂O, 1 µl každého z primerů a 2 µl izolované DNA. Podmínky reakce byly následující, 30 s při 98 °C, následovalo 35 cyklů 10 s při 98 °C, 20 s při 53 °C a 35 s při 72 °C. Po 35 opakováních probíhala reakce ještě dalších 5 min při 72 °C. Reakční směs pro druhé kolo o objemu 20 µl obsahovala 10 µl Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 7 µl H₂O, 1 µl obou primerů a 1 µl směsi z prvního kola PCR. Podmínky reakce byly následující: 30 s při 98 °C, následovalo 40 cyklů 10 s při 98 °C, 20 s při 53 °C a 20 s při 72 °C a finální extenze 5 min při 72 °C.

Positivní vzorky byly odhaleny pomocí gelové elektroforézy a následně byly tyto vzorky podrobeny Sangerovu sekvenování (SeqMe s.r.o., Česká republika). Získané sekvence byly porovnány s dostupnými sekvencemi v GenBank pomocí MegaBLAST a editovány za použití Geneious Prime software (Biomatters Ltd., New Zealand).

Výsledky

V rámci studie jsme otestovali celkem 262 vzorků krve a 564 vzorků ektoparazitů z různých druhů netopýřů z 6 zemí. V Bulharsku bylo odebráno a testováno 184, v Arménii 38 a v Gruzii bylo 40 vzorků krve. Celkem byl pozitivní záchyt filárií u 23 vzorků z celkového počtu 262, což činí průměrnou prevalenci filárií 8,8 % v krvi netopýřů. V Bulharsku je tato prevalence 4,9 % (pozitivních 9 ze 184), v Arménii 23,7 % (pozitivních 9 z 38) a v Gruzii 12,5 % (pozitivních 5 ze 40). Filárie v krvi byly zachyceny u druhu *Miniopterus schreibersii*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Myotis emarginatus* a *Myotis blythii*. Ektoparazité byli odebráni v Bulharsku (n=292), Arménii (n=74), Gruzii (n=92), Rusku (n=91), Česku (n=10) a na Slovensku (n=5). Celkem se jedná o 564 vzorků ektoparazitů. Výskyt filárií u odebraných parazitů byl zaznamenán ve 28 případech, a to v Bulharsku (12 pozitivních, prevalence 4,1 %), Arménii (4 pozitivní, prevalence 5,4 %), Gruzii (8 pozitivních, prevalence 8,7 %) a Rusku (4 pozitivní, prevalence 4,4 %) a celková prevalence filárií v ektoparazitech netopýřů tak činí 5 %. Druhové zastoupení pozitivních ektoparazitů bylo v širším spektru, jedná se o *Spinturnix psi* a *myoti*,

Ixodes simplex a *vespertilionis*, *Penicillidia dufouri*, *Nycteribia latreillei*, *kolenatii* a *schmidli*, *Eyndhovenia euryalis*, *Steatonyssus spinosus* a *Phthiridium biarticulatum*. Tyto pozitivní vzorky ektoparazitů byly odebrány u druhu *Miniopterus schreibersii*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Myotis myotis*, *Myotis capaccinii*, *Rhinolophus hipposideros* a *Vespertilio murinus*. Sekvenací byly určeny druhy filárií rodu *Litomosa* sp., nový druh příbuzný *Litomosa chiroptorum*, a dva nové druhy patřící do nového blíže neurčeného rodu čeledi Onchocercidae. Pozitivní vzorek krve i ektoparazita u jednoho jedince byl zaznamenán pouze v jednom případě v Bulharsku a ve třech případech v Arménii, kdy párové vzorky potvrdily stejný druh filárie, jak v krvi netopýra, tak v jejich ektoparazitech.

V této studii jsme se zaměřili na detekci filariální infekce u netopýrů a jejich ektoparazitů, jako na jednu z důležitých ale jen zdánlivě prozkoumaných oblastí v rámci infekční zátěže netopýrů. Celková prevalence filárií v krvi netopýrů činí 8,8 % a v jejich ektoparazitech 5 %. Detekovány byly filárie rodu *Litomosa* sp., Onchocercidae sp. ale také nové druhy příbuzné *Litomosa chiroptorum*, *Breinlia* sp. a naší Onchocercidae sp.

Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena grantem IGA VETUNI 224/2024/FVHE.

Seznam literatury:

- BAIN, O., BABAYAN, S., GOMES, J., ROJAS, G., GUERRERO, R. First account on the larval biology of a *Litomosoides* filaria, from a bat. *Parassitologia*. 2002, 44(1-2), 89-92.
- CASIRAGHI, M., ANDERSON, T.J.C., BANDI, C., BAZZOCCHI, C., GENCHI, C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology*. 2001, 122(1):93-103. doi:10.1017/S0031182000007149
- HORVAT, Ž., ČABRILO, B., PAUNOVIĆ, M., KARAPANDŽA, B., JOVANOVIĆ, J., BUDINSKI, I., BJELIĆ ČABRILO, O. The helminth fauna of the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) (Chiroptera: Rhinolophidae) on the territory of Serbia. *Biologia Serbica*. 2016, 37(1-2).
- MÉSZAROS, F., MAS-COMA, S. On some parasitic helminths from Spanish bats. *Parasitologia Hungarica*. 1980, 13, 59-64.
- MORAND, S., KRASNOV, B.R., POULIN, R. Micromammals and macroparasites: from evolutionary ecology to management. *Springer Science & Business Media*. 2007.
- PIKULA, J., PIACEK, V., BANDOUCHOVA, H., BARTLOVA, M., BEDNARIKOVA, S., BURIANOVA, R., DANEK, O., JEDLICKA, P., MASOVA, S., NEMCOVA, M., SEIDLOVA, V., ZUKALOVA, K., ZUKAL, J. Case report: Filarial infection of a parti-coloured bat: *Litomosa* sp. adult worms in abdominal cavity and microfilariae in bat semen. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023, 10. doi: 10.3389/fvets.2023.1284025
- RAMASINDRAZANA, B., DELLAGI, K., LAGADEC, E., RANDRIANARIVELOJOSIA, M., GOODMAN, S.M., TORTOSA, P. Diversity, Host Specialization, and Geographic Structure of Filarial Nematodes Infecting Malagasy Bats. *PLoS ONE*. 2016, 11(1): e0145709. doi: 10.1371/journal.pone.0145709
- RENDÓN-FRANCO, E., LÓPEZ-DÍAZ, O., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F., VILLALOBOS, G., MUÑOZ-GARCÍA C.I., ARÉCHIGA-CEBALLOS, N., ALFONSO-TOLEDO, J.A., GARCÍA FLORES, M.M., SETIÉN A.A. *Litomosoides* sp. (Filarioidea: Onchocercidae) Infection in Frugivorous Bats (*Artibeus spp.*): Pathological Features, Molecular Evidence, and Prevalence. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2019, 4: 77. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020077>.

Kontaktní adresa: Veronika Vévodová, Mgr., Ústav ekologie, chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23438@vfu.cz

Comparison of morphological and molecular identification of *Apodemus* species and AP-PCR optimization

¹Kozlíková Edita, ¹Bártová Eva, ²Čadková Zuzana

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

²Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

Summary

The yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) and the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) each occupy their own ecological niches and play different roles as reservoirs of zoonotic diseases. However, because these two species are morphologically very similar, it is often difficult to distinguish between them, especially in areas where their ranges overlap. For this reason, the aim of this study was to compare the effectiveness of morphological and molecular methods for identifying animals belonging to the genus *Apodemus*. AP-CR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) is a molecular technique that uses random primers to create unique DNA fingerprints for each species. This method has recently been optimized to distinguish between *Apodemus* species. In the initial assessment of 210 animals using morphological traits, 145 individuals (69 %) were identified as *A. sylvaticus* and 65 (31 %) as *A. flavicollis*. In contrast, AP-PCR analysis classified 157 animals (75 %) as *A. flavicollis* and 53 (25 %) as *A. sylvaticus*. Both identification methods agreed in 112 cases (53 %), while there was a discrepancy in 98 cases (47 %). Specifically, morphological analysis identified 95 animals as *A. sylvaticus*, but AP-PCR classified them as *A. flavicollis*, and 3 animals identified morphologically as *A. flavicollis* were classified as *A. sylvaticus* by AP-PCR. Samples of both *Apodemus* species (n=21), mainly those where the morphological and AP-PCR results differed, were sent for sequencing. The sequencing results confirmed the findings of the AP-PCR analysis in all samples. These results highlight the limitations of morphological identification and demonstrate that AP-PCR is a cost-effective and reliable tool for ecological and epidemiological research and shows strong potential as a method for identifying *Apodemus* species.

Keywords: yellow-necked mouse; wood mouse; species misclassification; molecular methods

Introduction

The yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) and the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) are ecologically distinct reservoirs of different zoonotic diseases, but they share morphological features that make reliable identification difficult. *A. sylvaticus*, which is a main reservoir for tick-borne pathogens such as *Borrelia burgdorferi* s.l., prefers fragmented habitats, while *A. flavicollis* is usually found in dense forests where the prevalence of these pathogens is lower (Hanincová et al., 2003). Distinguishing between these species is based on appearance using subtle characteristics like body size, tail length, and the presence of a yellow collar around the neck. However, these traits can vary with environmental conditions and depend on observer experience (Barčiová & Macholán, 2009). Incorrect identification of animal species can alter results of monitoring studies, so there is a need for reliable genetic tool. The aim of this study was to assess the effectiveness of AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) for distinguishing of two species of genus *Apodemus* and compare it with the traditional morphological identification.

Materials and methods

For this study, 210 animals of the genus *Apodemus* were used. The animals were caught by snap traps in various habitats near Sokolov, Czech Republic in 2024. The animals were identified by experienced scientists as either *A. sylvaticus* or *A. flavicollis* based on their morphological features, such as body weight, body length, tail length, hind foot length, ear length, and dental

characteristics. Typically, *A. flavicollis* has a yellow collar around the neck, and compared to *A. sylvaticus*, they have a longer tail (average 103 mm versus 89 mm), and a larger body size (average 28.4 g versus 23.5 g), although these characteristics can overlap where both species live together (Michaux et al., 2001). After identification, the animals were dissected and various tissues were collected for further analysis. To distinguish between *A. sylvaticus* and *A. flavicollis* at the molecular level, AP-PCR was performed and optimized using the E8S primer (5-TAAATGGGACAGGTAGGACC-3), which targets Exon 8 (Bugarski-Stanojevic et al., 2013). DNA was extracted from kidney tissues using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. To reduce non-specific primer binding, all reaction mixtures were prepared on ice pads to keep the temperature low, because keeping the primers at room temperature for longer time, can lead to non-specific binding, even if the reaction speed is reduced (Williams et al., 1990). The PCR reaction mixture (16 µL) consisted of 8 µL Master Mix, 3 µL primer, and 5 µL isolated DNA. In case of positive controls for both species, samples confirmed by sequencing were used; in negative controls PCR-grade water was used instead of DNA. The PCR program started with an initial denaturation at 94.4 °C for 5 min, followed by 47 cycles of denaturation (94.4 °C, 30 sec), annealing (49 °C, 1 min 15 sec), and extension (72 °C, 1 min 15 sec), with a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were analyzed on a 1.7% agarose gel at 120 V for 30 min. Specific patterns were observed for *A. sylvaticus* (three bands) and for *A. flavicollis* (four bands) with the following most distinguishable bands 240 bp for *A. sylvaticus* and 968 bp for *A. flavicollis*. The sizes of the PCR products were estimated by using a 50 bp DNA ladder before it would be precisely set by sequencing. So far, efforts to sequence individual bands have been unsuccessful. Therefore, till now, the sizes of bands are based on the results from study of Reutter et al. (2003). Positive controls and some chosen samples (n=21) in which there was a difference between morphological and AP-PCR determination were sent for Sanger sequencing. PCR for sequencing was performed according to the Reutter et al. (2003) with using primers amplifying cytochrome b gene, specific for the genus *Apodemus*, with primers CB-AF (5'-ATCAGACACAATAACAGCATT-3') and CB-AR2 (5'-GTTCTACTGGTTGACCTC-3') amplifying an 866 bp fragment.

Results and discussion

Samples of genus *Apodemus*, used in this study, came from animals that were identified based on the morphological traits (body weight, body length, tail length, paw length and ear length) as *A. sylvaticus* (69 %, 145/210) and *A. flavicollis* (31 %, 65/210). The molecular method (AP-PCR), that was optimized at our department, showed more *A. flavicollis* (75 %, 157/210) than *A. sylvaticus* (25 %, 53/210) (Tab. 1). There was agreement in both methods in 53 % (112/210) of animals, but there was a discrepancy in both methods in 47 % (98/210) of animals. Of those, 95 animals morphologically identified as *A. sylvaticus* were identified by AP-PCR as *A. flavicollis*, on the other hand, 3 animals identified morphologically as *A. flavicollis* were identified by AP-PCR as *A. sylvaticus*.

Table 1: Identification of 210 *Apodemus* species using morphological determination and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)

Species	Morphology	AP-PCR
<i>Apodemus flavicollis</i>	65 (31%)	157 (75%)
<i>Apodemus sylvaticus</i>	145 (69%)	53 (25%)

Results from sequencing were compared with sequences in the National Library of Medicine, which confirmed the species determined by AP-PCR. Reutter et al. (1999) wrote that the misidentification of species with using morphological features may probably come from

environmental variation of animals (for example, nutrient availability can change body size by up to 18 %) or from observer bias, since the differences between the researchers' measurements were as much as 12 % when measuring the same tail length. Additionally, Michaux (2002) noted that juvenile *A. flavicollis* (n=41) lacked yellow collars in 87 % of cases, which makes identification of species by appearance even more difficult. Also, environmental factors, such as living in different altitudes can influence body sizes (smaller body size at higher altitude), and thus making the species identification more complicated and resulting in false species identification. All these things underline the importance of using molecular methods in ecological and epidemiological studies to allow clear differentiation between *A. sylvaticus* and *A. flavicollis*.

Conclusion

Findings from this study highlight that identifying *A. sylvaticus* based on physical traits is unreliable, especially in areas where their habitats overlap with *A. flavicollis*. Without genetic confirmation distinguishing between both *Apodemus* species, the research can lead to bias, particularly in studies focusing on risks of spreading infections. Successful implementation of molecular method AP-PCR in laboratory underscores its potential as a precise tool for taxonomic studies to obtain accurate results without waiting for expensive sequencing. The AP-PCR method is currently optimized to distinguish three (*Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*) of four *Apodemus* spp. species present in the Czech Republic.

Acknowledgements

Thanks for financial support from internal grant ITA VETUNI (2024ITA23), and thanks to Dr. Papoušek for consultations in the field of molecular methods.

References

- BARČIOVÁ, L.; MACHOLÁN, M. Morphometry key for the discrimination of two wood mice species, *Apodemus sylvaticus* and *A. flavicollis*. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 2009, vol. 55, s. 31–38.
- BUGARSKI-STANOJEVIĆ, V.; BLAGOJEVIĆ, J.; ADNAĐEVIĆ, T.; JOVANOVIĆ, V.; VUJOŠEVIĆ, M. Identification of the sibling species *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Muridae) Comparison of molecular methods. Online. *Zoologischer Anzeiger*. 2013, vol. 252, no. 4, s. 579–587.
- HANINCOVÁ, K.; SCHÄFER, S. M.; ETTI, S.; SEWELL, H.-S.; TARAGELOVÁ, V.; ZIAK, D., LABUDA, M., KURTENBACH, K. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*. 2003, vol. 126, no. 1, s. 11–20.
- MICHAUX, J. R.; KINET, S.; FILIPPUCCI, M.-G.; LIBOIS, R.; BESNARD, A.; CATZEFLIS, F. Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in western Europe (Muridae: Rodentia). *Molecular Ecology Notes*. 2001, vol. 1, no. 3, s. 260–263.
- REUTTER, B. A.; HAUSSER, J.; VOGEL, P. Cranial discriminant analysis in *Apodemus*. *Journal of Zoological Systematics*. 1999, vol. 37, no. 3, s. 129–137.
- REUTTER, B. A.; PETIT, E.; BRÜNNER, H.; VOGEL, P. Cytochrome *b* haplotype divergences in West European *Apodemus*. *Mammalian Biology*. 2003, vol. 68, no. 3, s. 153–164.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990, vol. 18, no. 22, s. 6531–6535.

Contact address: Kozlíková Edita, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE, VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno, H23456@vfu.cz/sitera@seznam.cz

Collision risk of red kites (*Milvus milvus*) with wind turbines revealed by GPS telemetry

Jan Škrábal^{1,2}, Rainhard Raab², Martin Gruebler³, Ivan Literák¹, Rainer Raab²

¹ University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic; ² TB Raab GmbH, Austria; ³ Swiss Ornithological Institute, Switzerland

Summary

This study investigates 41 confirmed collisions of red kites (*Milvus milvus*) with wind turbines across Europe using GPS telemetry data from 2,943 tagged birds. Collisions occur throughout the year, with the highest mean daily rates during migration. Bayesian models showed that rotor clearance and rotor diameter significantly affect collision probability. Other factors like weather and turbine density were not significant predictors. The findings support turbine planning that considers bird flight behaviour and seasonal movement, aligning with recent model predictions on raptor-turbine interactions.

Keywords: GPS telemetry; wind energy; collision risk; raptors; red kite

Introduction

Wind turbines play an important role in the global movement towards renewable energy, reducing greenhouse gas emissions and mitigating the effects of rapidly occurring climate changes. In Europe, many wind farms are currently operating and more are demanded for the near future (Wind Energy Council, 2022). Such growth in wind energy infrastructure has raised concerns about its environmental impact, particularly in regard to collisions with wildlife (Smallwood, 2013). Birds are particularly vulnerable to collisions with wind turbines (Smallwood et al., 2007). Specifically, large broad-winged species of birds (such as accipiters, vultures, and storks) in soaring flight frequently harvest the same wind conditions (thermals and orographic wind currents) that render certain areas optimal for wind farms, thereby spawning conflicts between raptors and turbines. (Sandhu et al., 2022). Several studies have examined bird interactions with wind turbines, using methods like carcass searches and GPS telemetry to assess collision risks (Vignali et al., 2022). However, gaps remain, as data recorded during collisions under real-life circumstances is lacking, complicating mitigation efforts (Aschwanden et al., 2024). Our study aims to investigate the effect of wind turbine characteristics and weather behind collisions with turbines by providing detailed descriptions of 41 recorded collision events of red kites, using data obtained from Global Positioning Systems (GPS) satellite telemetry.

Materials and Methods

We analyzed GPS-GSM telemetry data from 41 red kites that collided with turbines, drawn from a larger dataset of 2,943 tagged individuals across Europe. Locations were standardized to 1-hour intervals using R packages and resampling routines (Signer et al., 2019). Bayesian GLMMs were constructed in R using brms (Bürkner, 2018), with random intercepts for bird ID and wind park to account for repeated measures. Weather data from ECMWF ERA5 were linked to GPS data using the Movebank annotation tool (Dodge et al., 2013).

Results

We analyzed wind turbine collisions involving 41 red kites tagged with GPS-GSM telemetry transmitters. Most collisions (78 %) occurred in Germany, Spain, and Austria. Although most collisions occurred during the summer and winter periods, the highest mean number of collisions per day were observed during spring and autumn migration periods. Specifically, the

mean number of collisions was 0.12 collisions per day in summer, 0.07 in winter, 0.28 for the spring migration, and 0.21 for autumn migration. Our Bayesian model revealed strong effects of rotor clearance and rotor diameter on the relative collision probability of the studied birds. Rotor clearance had a negative effect on collision probability, indicating that collisions happened to wind turbines with less clearance. Similarly, the rotor diameter was an important predictor of collisions, with larger rotors increasing the likelihood of collisions (Figure 1). The number of wind turbines within a 500 m radius, cloud cover, wind speed, and precipitation showed weak effect, compared to rotor diameter and clearance, with high uncertainty as their 95% credible interval included zero. The random effect estimate for wind park was larger (estimate = 1.52) than the random effect estimates for individuals, suggesting that collisions were more influenced by wind park differences than individual bird differences.

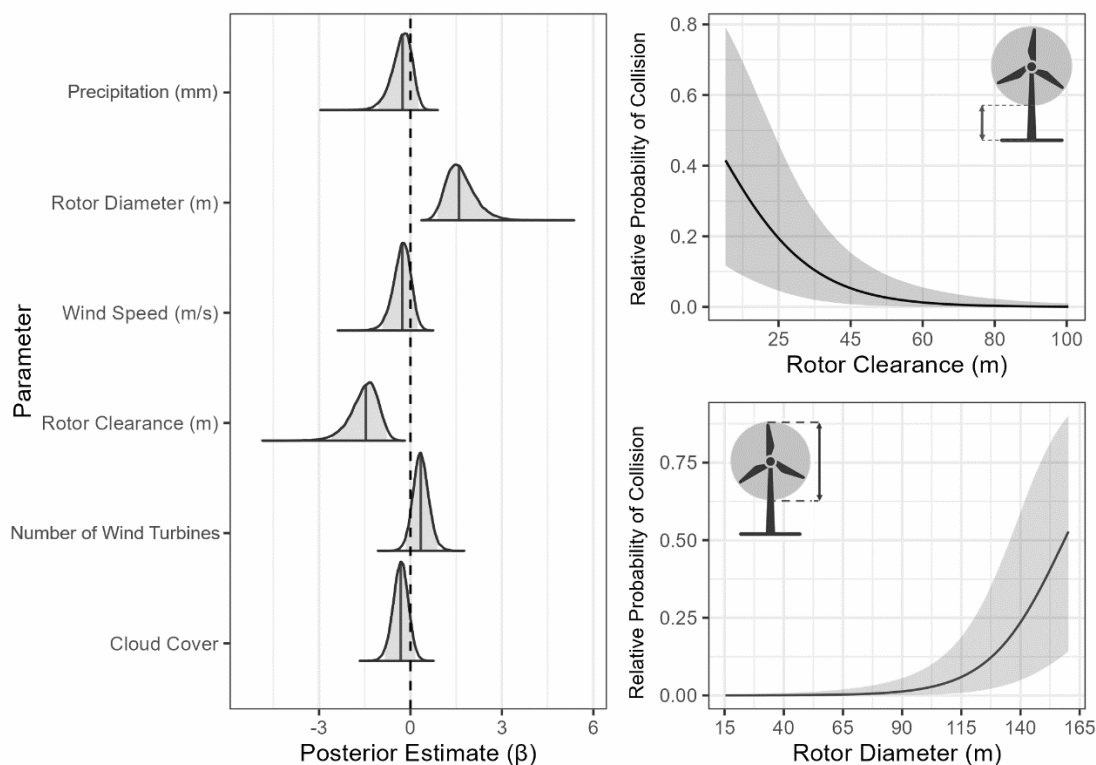


Figure 1 Left: Posterior distributions of the scaled fixed effects in the model, showing the estimated effects of each predictor on collision probability. The density plots represent the uncertainty around the parameter estimates, with values centered around zero indicating weak or no effect. Right: Effect plots for significant variables, illustrating the relationship between rotor clearance (top) and rotor diameter (bottom) with the probability of collision. Shaded areas represent 95% credible intervals.

Discussion

Our results show clear associations between wind turbine characteristics and relative collision probability in the studied red kites. We found strong support that rotor clearance influences the relative collision probability. Turbines with greater clearance exhibited a lower probability of collision, likely due to reduced overlap with red kite flight paths, which generally occur at altitudes between 5 and 60 m (Pfeiffer & Meyburg, 2022). This aligns with findings that species flying predominantly at lower altitudes, such as red kites, benefit from higher rotor clearance

(Schaub et al., 2024). Our results reinforce the importance of designing turbines to minimize overlap with bird flight paths to reduce collision risk. However, while higher rotor clearance is beneficial for many species, its effectiveness depends on species-specific flight behaviours, which vary across regions and migratory pathways (Schaub et al., 2024). Regarding rotor diameter, our Bayesian model provides strong support for an association between larger rotor diameters and increased collision probability. Larger turbines, with diameters up to 160 meters, expand the volume of airspace affected by rotor blades, increasing the challenge for birds to avoid them. However, larger turbines have also been shown to reduce the overall number of turbines required for the same energy output, potentially mitigating collision risk by decreasing turbine density and increasing rotor clearance (Therkildsen et al., 2021). Based on our model, theoretically, a 25.5-meter increase in rotor diameter (equivalent to one standard deviation in our dataset) is associated with a 5-fold increase in the odds of a collision. To offset this elevated risk through turbine design, rotor clearance would need to increase by approximately 19.3 meters. Achieving the same risk reduction through turbine density alone would require the removal of nearly nine turbines within a 500-meter radius—a magnitude well beyond the observed density in our data (mean = 3.3 turbines per 500 meters). This further supports the idea that combining larger rotor diameters with increased turbine clearance could help balance collision risk reduction with energy optimization. Nevertheless, while this trade-off suggests that careful wind farm planning helps minimize risks, the cumulative impact of wind energy on bird populations remains a central conservation concern. Therefore, effective mitigation strategies should not only focus on turbine design but also establish population-level impact thresholds and optimize wind farm configurations accordingly.

Acknowledgements

The project was supported by the LIFE EUROKITE project (LIFE18 NAT/AT/000048), the Swiss National Science Foundation, and many partners involved in bird tagging and data provision.

Literature

ASCHWANDEN, J., STARK, H., & LIECHTI, F. Flight behaviour of Red Kites within their breeding area in relation to local weather variables: Conclusions with regard to wind turbine collision mitigation. *Journal of Applied Ecology*. 2024.

BÜRKNER, P.C. Advanced Bayesian multilevel modeling with the R package brms. *The R Journal*. 2018, vol. 10, s. 395–411.

DODGE S, BOHRER G, WEINZIERL R, DAVIDSON SC, KAYS R, DOUGLAS D, ET AL. The environmental data automated track annotation (Env DATA) system: linking animal tracks with environmental data. *Movement ecology*. 2013, s. 1-3.

PFEIFFER, T. & MEYBURG, BU. Flight altitudes and flight activities of adult Red Kites (*Milvus milvus*) in the breeding area as determined by GPS telemetry. *Journal of Ornithology*. 2022, vol. 163, s. 867–879.

SANDHU, R., TRIPP, C., QUON, E., THEDIN, R., LAWSON, M., BRANDES, D., FARMER, C. J., MILLER, T. A., DRAXL, C., DOUBRAWA, P., WILLIAMS, L., DUERR, A. E., BRAHAM, M. A., & KATZNER, T. Stochastic agent-based model for predicting turbine-scale raptor movements during updraft-subsidized directional flights. *Ecological Modelling*. 2022, vol. 466, 109876.

SCHAUB, T., KLAASSEN, R.H.G., DE ZUTTER, C., ALBERT, P., BEDOTTI, O., BOURRIOUX, J.-L., BUIJ, R., CHADŒUF, J., GRANDE, C., ILLNER, H., ISAMBERT, J., JANSSENS, K., JULIUS, E., LEE, S., MIONNET, A., MÜSKENS, G., RAAB, R., VAN RIJN, S., SHAMOUN-BARANES, J.,

SPANOGHE, G., MILLON, A. Effects of wind turbine dimensions on the collision risk of raptors: A simulation approach based on flight height distributions. *Science of The Total Environment*. 2024, vol. 954, 176551.

SMALLWOOD K.S. Comparing bird and bat fatality-rate estimates among North American wind-energy projects. *Wildlife Society Bulletin*. 2013.

SMALLWOOD K.S., BELL D.A., STANDISH J.D. Monitoring Bird and Bat Fatalities at the High Winds Wind Energy Project in Solano County, California. *Journal of Wildlife Management*. 2007.

THERKILDSEN, O. R., BALSBY, T. J. S., KJELDSSEN, J. P., NIELSEN, R. D., BLADT, J., & FOX, A. D. Changes in flight paths of large-bodied birds after construction of large terrestrial wind turbines. *Journal of Environmental Management*. 2021, vol. 290, 112647.

VIGNALI, S., LÖRCHER, F., HEGGLIN, D.P., ARLETTAZ, R., BRAUNISCH, V. A predictive flight-altitude model for avoiding future conflicts between an emblematic raptor and wind energy development in the Swiss Alps. *Royal Society Open Science*. 2022, 9211041

Kontaktní adresa: Jan Škrábal, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22340@vfu.cz

Evolučné adaptácie a rezistencia u *Escherichia coli* ST744

Evolutionary adaptations and resistance in *Escherichia coli* ST744

^{1,2}Kristína Krúteková, ³Kristína Nešporová, ^{2,4}Jana Palkovičová, ^{1,2, 4, 5, 6}Monika Dolejská, ³Sander K. Govers

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

²Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Plzeň

³Ústav biologie, KU Leuven, Belgicko

⁴Středoevropský technologický institut, Veterinární univerzita Brno

⁵Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Brno

⁶Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Brno, Brno

Summary

Escherichia coli ST744 is a globally distributed, high-risk zoonotic lineage associated with extraintestinal infections and antimicrobial resistance. This study aimed to investigate the genetic and phenotypic characteristics of ST744 that may contribute to its dissemination and persistence in diverse environments. Phylogenetic analysis revealed two major clusters of this lineage, from which selected strains were characterised phenotypically in detail under optimal and stress conditions. Resistance genes for at least three classes of antibiotics were present in 96% of the strains, and genes for resistance to mercury and disinfectants were also identified. Comparative genomics revealed a variable stretch with the *betU* gene (possible role in osmoprotection), absent in MG1655, and cold-shock proteins. Growth curves showed that *betU* does not affect growth under osmotic stress, while cold-shock proteins appear to promote growth at low temperatures. The results suggest that ST744 has the potential for adaptation.

Keywords: ExPEC; *Escherichia coli* ST744; multiresistance; metabolism genes, fitness

Úvod

Extraintestinálne patogénne kmene *Escherichia coli* (ExPEC) sú pôvodcami závažných infekcií, ako sú meningitídy či bakterémie. Medzi ne patrí aj celosvetovo rozšírený sekvenčný typ (ST) 744, spojený s multirezistenciou. Jeho častý výskyt v rôznych prostrediach – klinický materiál, odpadové vody, voľne žijúce vtáky – naznačuje vysoký adaptačný potenciál (Abraham *et al.*, 2015; Ćwiek *et al.*, 2021). Preliminárne genómové analýzy odhalili metabolické gény, ktoré môžu ovplyvňovať biologickú zdatnosť (*fitness*), no chýbajú systematické štúdie ich vplyvu. V rámci projektu sme sa zamerali na preskúmanie vplyvu génov pre metabolizmus na *fitness* tohto kmeňa v rôznych podmienkach.

Materiál a metódy

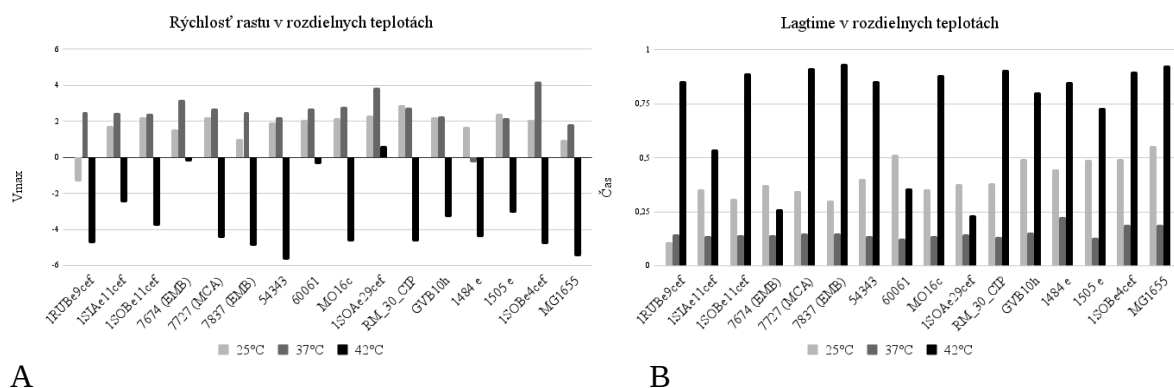
Prebehla fylogenetická analýza celogenómových sekvenčných dát súboru 913 izolátov. V genómoch boli identifikované relevantné genetické markery. Analýzy boli realizované pomocou softvéru Geneious 9.0.5 a ďalších nástrojov, ako sú pMLST 1.4, PHASTER, ISfinder či BRIG v0.95. Komparatívna analýza s kmeňom MG1655 bola uskutočnená pomocou dvoch izolátov sekvenovaných technológiou dlhých čítaní. Celogenómová DNA bola izolovaná pomocou súpravy Genfind V3 (Beckman Coulter, USA), pripravená rapid barcoding kitom (SQK-RBK004) a sekvenovaná na flow cell FLO-MIN106 počas 48 hodín. Výstupné dáta boli spracované pomocou hybridnej zostavy (Unicycler, Flye) na rekonštrukciu chromozómu a plazmidov. Za účelom analýzy vzťahu génov pre metabolizmus s celkovým *fitness* baktérie, bolo pre tento projekt na základe génov pre metabolizmus vybraných 30 kmeňov *E. coli*. Prevažovali kmene ST744 (n = 23) doplnené o ST57, ST69, ST93, ST131, ST155, ST354 a

ST457. Pochádzali z klinických vzoriek, odpadových vôd, hydiny a voľne žijúceho vtáctva. U izolátov bola stanovená minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) pomocou komerčne dostupných súprav MIC GN1 a GN2 (96-jamkové mikrotitračné platničky s koncentračným gradientom antibiotík) a výsledky boli interpretované podľa kritérií EUCAST. Na základe porovnania fenotypových výsledkov s genomickými dátami bolo vybraných 15 kmeňov (*E. coli* ST744, n = 12; ST69, ST155 a ST354), ktoré boli kultivované na LB agare pri 37 °C, prenesené do tekutého LB média a po 18-hodinovej inkubácii za trepania (200 RPM) nariedené (1:100) do 96-jamkových mikrotitračných platničiek. Rast bol monitorovaný prístrojom Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, USA) v 15-minútových intervaloch počas 24 hodín. Sledovaný bol vplyv rôznej teploty (25 °C, 37 °C a 42 °C) v súvislosti s prítomnosťou *cold-shock* proteínov, ako aj účinok génu *betU*, kódujúceho transportér pre osmoprotektívny glycin betaín, v troch osmotických podmienkach (2,5 % NaCl, 2,5 % NaCl s 150 µM betaínom a bez aditív). Biologická zdatnosť bola hodnotená na základe rýchlosti rastu (V_{max}) a dĺžky lag fázy (Lagtime).

Výsledky

Súbor *E. coli* ST744 pochádzal z 51 krajín a rôznych zdrojov (potravínové zvieratá, jedlo, človek, prostredie, voľne žijúce zvieratá). Fylogenetická analýza rozdelila izoláty podľa sérotypu do troch hlavných vetiev. Dominovali sérotypy H9:O101 (56 %) a H10:O101 (41 %), zatiaľ čo H25:O101 predstavoval minoritnú skupinu. Izoláty niesli klinicky významné gény rezistencie, prenášané plazmidmi, a to voči cefalosporínom, fluorochinolónom, karbapenémom a kolistínu. Všetky ďalej analyzované kmene (n=30) vykazovali multirezistentný fenotyp a boli rezistentné voči minimálne štyrom skupinám antibiotík. Najčastejšie bola zaznamenaná rezistencia voči tetracyklínom (tigecyklín) a fluorochinolónom (ciprofloxacín), obe s výskytom 100 %. Nasledovala rezistencia voči nechráneným penicilínom, ampicilín a piperacilín, 96 %. Pri cefuroxíme (2. generácia cefalosporínov) išlo o 36 % izolátov, zatiaľ čo na cefepím (4. generácia) zostali takmer všetky kmene citlivé. Rezistencia voči karbapenémom sa vyskytovala len ojedinele.

Komparatívna genomika odhalila prítomnosť špecifickej variabilnej oblasti v genóme *E. coli* ST744, absentujúcej u referenčného kmeňa MG1655, obsahujúcu gény rezistencie voči antibiotikám, ortuti a kvartérnym amóniovým zlúčeninám. Táto oblasť zahŕňala aj gén *betU* (kódujúci transportér pre osmoprotektívny glycin betaín), ako aj gény pre *cold-shock* proteíny.



Obrázok 1: Vplyv teploty na kmene obsahujúce *cold-shock* proteíny. A - Vplyv teploty na V_{max} , B - Vplyv teploty na Lagtime.

Rastové krivky ukázali, že *cold-shock* proteíny pravdepodobne pozitívne ovplyvňujú rast pri 25 °C – parametre boli porovnateľné s rastom pri 37 °C. Pri 42 °C boli hodnoty výrazne odlišné (Obrázok 1). Napriek prítomnosti *betU* sa parametre rastu kmeňov počas podmienok osmotického stresu výrazne nezmenili, čo naznačuje, jeho nízky vplyv v použitých experimentálnych podmienkach.

Diskuse

Naša štúdia potvrdzuje, že *Escherichia coli* ST744 je multirezistentný klon s výraznou ekologickou flexibilitou, čo zodpovedá predchádzajúcim poznatkom o ExPEC (Manges *et al.*, 2019). Prítomnosť génov rezistencie voči antibiotikám, ortuti a dezinfekčným látkam naznačuje adaptáciu na antropogénne prostredie. Rastové experimenty ukázali, že *cold-shock* proteíny podporujú rast pri suboptimálnych teplotách, čo môže napomáhať prežitiu mimo hostiteľa. Táto schopnosť je významná najmä v kontexte environmentálneho kolobehu ExPEC, kde sa predpokladá ich prenos medzi zvieratami, človekom a vodným prostredím. Naproti tomu sa gén *betU* za testovaných podmienok neprejavil ako významný faktor rastovej výhody pri osmotickom strese, čo môže súvisieť s úrovňou expresie alebo kompenzáciou inými mechanizmami. Tieto výsledky podporujú hypotézu, že ST744 je adaptabilný klon schopný šírenia naprieč ekosystémami. Ďalší výskum by sa mal zamerať na funkčnú charakterizáciu ďalších génov ovplyvňujúcich ekologickú plasticitu.

Záver

Naša štúdia prináša nové poznatky o faktoroch ovplyvňujúcich biologickú zdatnosť kmeňov *E. coli* ST744, významného extraintestinálneho patogénu s multirezistentným profilom. Výsledky naznačujú, že génová výbava prispieva k rastu aj pri suboptimálnych teplotách. Naopak, prítomnosť génu *betU* kódujúceho transportér pre osmoprotektívny glycin betaín sa v testovaných podmienkach neprejavila ako významný determinant *fitness* pri osmotickom strese. Tieto zistenia prispievajú k pochopeniu ekologickej a patogénnej flexibility ST744 a poukazujú na potrebu ďalšej funkčnej analýzy kľúčových génov podporujúcich prežítie a šírenie multirezistentných kmeňov v rôznych prostrediach.

Poděkování

Štúdia bola finančne podporená projektom IGA VETUNI 206/2024/FVHE a grantom Grantové agentury České republiky 24-12527S.

Literatura

ABRAHAM, Sam, *et al.* First detection of extended-spectrum cephalosporin-and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2015, 3.4: 273-277.

ĆWIEK, Katarzyna, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of mcr-1-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52.3: 1597-1609.

MANGES, A.R., Hwang, J.G. a Papagiannitsis, C.C. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2019, 32(3), e00135-18. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>.

Kontaktní adresa: Kristína Krúteková, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23431@vfu.cz

Diverzita, hostitelské vazby a geografické rozšíření všenek rodu *Myrsidea* (Amblycera: Menoponidae)

Diversity, host associations and geographical distribution of lice of the genus *Myrsidea* (Amblycera: Menoponidae)

¹Schneider Marek, ⁵Kolencik Stanislav, ²Johnson Kevin Paul, ³Weckstein Jason David, ⁴Sallam Mohamed Fahim, ⁴Allen Julie, ¹Sychra Oldrich

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

²Illinois Natural History Survey, Prairie Research Institute, University of Illinois at Urbana Champaign, Champaign, IL 61820, USA

³Department of Ornithology, Academy of Natural Sciences of Drexel University and Department of Biodiversity, Earth, and Environmental Sciences, Drexel University, 1400 Benjamin Franklin Parkway, Philadelphia, PA 19103, USA

⁴Department of Biological Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA

⁵Faculty of Mathematics, Natural Sciences, and Information Technologies, University of Primorska, Glagoljaška 8, 6000 Koper, Slovenia

Summary

With a total of 382 described species, *Myrsidea* Waterston, 1915 represents the most diverse genus of avian chewing lice. *Myrsidea* has a global distribution, is thought to be highly host-specific, and parasitizes mostly passerine birds (366 species on a total of 488 passeriform host species from 57 families). The remaining 16 species of *Myrsidea* parasitize 13 species of toucans (Ramphastidae) and 3 species of hummingbirds (Trochilidae). In general, species of *Myrsidea* are highly host-specific, with 78% of *Myrsidea* species restricted to a single host species; others occur on 2–11 closely related species. The only extreme case of a generalist *Myrsidea* seems to be the *M. quadrifasciata* species complex, which has been reported from 35 host species belonging to 8 passerine families. Synoxenic distribution of *Myrsidea*, i.e., the presence of more than one *Myrsidea* species on the same host species, has been reported for 58 bird species, with 43 host species are known to harbor only 2 *Myrsidea* species, while the other 13 host species harbor 3–9 *Myrsidea* species. Based on the type of genital sac sclerite we divided *Myrsidea* species into 63 morphotype groups. The highest diversity of morphotype groups was found in Indomalaya, where *Myrsidea* belonging to 37 (58%, $n = 63$) morphotype groups occur. A total of 39 (62%) morphotype groups are found in only one biogeographic region. On the other hand, 3 morphotype groups - *rustica*, *thoracica*, and *quadrifasciata* - have cosmopolitan distributions.

Keywords: birds; morphology; taxonomy

Úvod

Rod *Myrsidea* Waterston, 1915 (Phthiraptera: Menoponidae) má celosvětové rozšíření, a je to jeden z druhově nejpočetnějších rodů všenek (Price et al., 2003; Sychra et al., 2021). Více než 95 % druhů z tohoto rodu parazituje u ptáků z řádu pěvci (Price et al., 2003), který je zároveň největším řádem ptáků, kdy celková diverzita zahrnuje okolo 2/3 všech druhů. Zároveň se předpokládá, že celková diverzita rodu *Myrsidea* čítá až okolo tisíců nepopsaných druhů (Valim and Weckstein, 2013). Právě tato rozmanitost představuje jedinečnou příležitost k popisu nových druhů, rozšířit již existující srovnávací materiál, zároveň také možnost aplikovat moderní genetické metody, například celogenomové sekvenování (Johnson, 2022) a poskytnout tak komplexní data ve výzkumu všenek rodu *Myrsidea*.

Materiál a metody

Tato studie se zaměřuje na přehled rodu *Myrsidea*, kdy byl vytvořen seznam, který obsahuje výčet taxonů a hostitelských vazeb s komplexním souborem dat ze všech dosud dostupných

publikací doplněných o další informace získaných studiem dostupných preparátů. Jedná se o údaje z celkem 301 publikací. Ve výsledném přehledu byly hodnoceny zejména všenko-hostitelské vazby, ptačí hostitelé (druhy i poddruhy), biogeografické oblasti a lokality výskytu, odkud byly druhy rodu *Myrsidea* hlášeny. Pro seskupení druhů s podobnými morfologickými znaky byly vytvořeny tzv. druhové skupiny, „morphotype group“ (Clay, 1966; Klockenhoff, 1984; Sychra et al., 2021). Jako sjednocující znak těchto druhových skupin byl určen typ samčího genitálního skleritu a na základě tohoto rozdělení bylo vytvořeno 63 druhových skupin. Pro zpracování dat byly využity programy Gephi a ArcGIS, kdy pro celkovou vizualizaci byly vytvořeny obrázky.

Výsledky

Celkem bylo zaznamenáno 382 druhů rodu *Myrsidea*, přičemž od posledního checklistu (Price et al., 2003) bylo průměrně popsáno 9 nových druhů každý rok. Bylo zjištěno, že 366 druhů se vyskytuje na celkem 488 hostitelských družích pěvců z 57 čeledí. Zbývajících 16 druhů *Myrsidea* parazituje na nepěvcích z dalších 2 čeledí - 13 druhů na 13 družích tukanů z čeledi Ramphastidae a 3 druhy na 3 kolibřících z čeledi Trochilidae. Obecně jsou druhy rodu *Myrsidea* vysoce hostitelsky specifické, přičemž 78 % druhů je omezeno pouze na jeden druh hostitele, což zároveň celkový přehled této studie potvrdil. Většina zbývajících druhů (17,8 %) se vyskytuje na 2-3 blízce příbuzných hostitelských družích a několik druhů (2,4 %) se vyskytuje na 4-5 různých hostitelských družích ze stejné hostitelské čeledi. Pouze 7 druhů rodu *Myrsidea* (1,8 %) bylo zaznamenáno na více než 5 družích hostitelů: *M. fuscomarginata* a *M. dissimilis* (6 hostitelských druhů), *M. ochracei* (7), *M. rustica* (8), *M. psittaci* (10) a *M. thoracica* (11). Naopak extrémním příkladem generalisty se ukázal druh *M. quadrifasciata*, který byl zaznamenán u celkem 35 druhů hostitelských druhů z celkem 8 čeledí pěvců.

V rámci poznatků uvedených v přehledu byl v programu Gephi vytvořen obrázek, který dává do souvislosti jednotlivé morfotypy v závislosti na jejich hostitelských družích rozdělených do jednotlivých čeledí pěvců. S využitím stejného programu byl vytvořen obrázek, který dává do souvislosti jednotlivé morfotypy v závislosti na jejich geografickém rozšíření (6 geografických oblastí).

Nejrozmantější oblastí s ohledem na morfotypové skupiny definované genitálním skleritem je Indomalajská oblast zastoupena celkem 37 morfotypovými skupinami (58 %, n = 63). Následované Australasií s výskytem 20 morfotypových skupin (31 %), Neotropickou oblastí s 19 skupinami (30 %), Afrotropickou oblastí s 18 skupinami (29 %), Palearkem s 12 skupinami (19 %, n = 63) a Nearktickou oblastí s 10 skupinami (16 %). Celkem 39 (62 %) morfotypových skupin se vyskytuje minimálně v jedné geografické oblasti. Na druhou stranu 3 morfotypové skupiny – *rustica*, *thoracica*, a *quadrifasciata* – mají kosmopolitní rozšíření.

Dále prostřednictvím programu ArcGIS byla vytvořena mapa reprezentující počty publikací zahrnující všenko rodu *Myrsidea* publikovaných v jednotlivých zemích světa. Přičemž lokalitami s nejvíce publikacemi – USA, Brazílie, Jihoafrická republika, se středním až vyšším počtem publikací – Argentina, Indie, Jižní Korea, Thajsko, se středním počtem – Čína, Rusko, Austrálie, některé evropské země, nízký a žádný počet se týkal hlavně většiny zemí Afriky, Arabského poloostrova, Střední Asie a některých evropských států.

Diskuse

Souhrnný přehled prezentovaný v této studii dokládá mimořádnou diverzitu všenek rodu *Myrsidea* parazitujících na pěvcích. Z dostupných dat je zřejmé, že značná část této druhové rozmanitosti zůstává dosud nezdokumentována. Právě ucelený přehled umožňuje nejen informace o aktuálním stavu poznání, ale i identifikaci geografických a taxonomických mezer, které by mohly být prioritou budoucího výzkumu.

Zaznamenáním lokalit sběru a přiřazením publikovaných druhů k jednotlivým oblastem jsme byli schopni vytvořit obraz prostorového rozložení dosavadního výzkumu. Z analýzy vyplývá, že řada regionů je buď zcela neprobádaná, nebo zde existuje jen minimální dokumentace – příkladem mohou být země jako Kuba, Pobřeží slonoviny či Kazachstán. Tyto oblasti přitom často vykazují vysokou diverzitu ptáků, což naznačuje značný nevyužitý potenciál pro objev nových druhů všenek. Naopak, regiony s dlouhodobou výzkumnou aktivitou, jako je například Brazílie, představují výjimku. Přesto však i zde existuje vysoký odhadovaný počet dosud nepopsaných druhů (Valim and Weckstein, 2013), který může přesahovat 900 druhů pouze v rámci tohoto území.

Příkladem morfotypů s hostitelskou specifikou mohou být druhové skupiny *aegithali* a jediným druhem *M. aegithali* vyskytující se pouze u dvou druhů mlynaříků čeledi Aegithalidae a *flavida* s jediným druhem *M. flavida* vyskytujícím se pouze u jednoho druhu loboše čeledi Eurylaimidae. Naopak morfotyp *franciscocoli* může být příkladem druhové skupiny s větším počtem hostitelských skupin, přičemž ale typový druh, *M. franciscocoli*, se opět vyskytuje pouze na dvou hostitelích z čeledi Cinclidae.

Závěr

Přehled, který měl v rámci této studie možnost vzniknout ukazuje, jak diverzní právě všenyky rodu *Myrsidea* jsou. Je jasné, že značná část druhové rozmanitosti dosud stále nebyla zachycena. Zároveň do budoucna může dát prostor pro práci zaměřenou na morfologii jednotlivých druhů, možnost popisu nových druhů, sběru dalšího srovnávacího materiálu, nebo výzkum v oblastech, kde není zaznamenána žádná studie zabývající se hostitelskými vazbami všenek a ptáků a rozšířit tak celkové dosavadní znalosti o všenkách rodu *Myrsidea*.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem ITA VETUNI (projekt č. 2025ITA23).

Literatura

CLAY, T. Contributions towards a revision of *Myrsidea* Waterston (Menoponidae: Mallophaga) I. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*. 1966, 17(8), s. 327–395.

KLOCKENHOFF, H. Mallophagen der Gattung *Myrsidea* Waterston, 1915 von afrikanischen Webervogeln (Ploceidae)—II. *Bonn Zool Beitr*. 1984, 35(1–3), s. 269–284.

JOHNSON, K.P. Genomic approaches to uncovering the coevolutionary history of parasitic lice. *Life* (Basel, Switzerland). 2022, 12(9), s. 1442.

PRICE, R.D.; HELLENTHAL, R.A.; PALMA, R.L.; JOHNSON, K.P.; CLAYTON, D.H. *The chewing lice: world checklist and biological overview*. Special Publication 24. Champaign (IL): Illinois Natural History Survey; 2003. s. 501.

SYCHRA, O.; KOLENČIK, S.; PAPOUSEK, I.; BILBIJA, B.; LITERAK, I. *Myrsidea quadrifasciata* (Phthiraptera: Amblycera) - a unique host generalist among highly host-specific chewing lice. *Arthropod Syst. Phylogeny*. 2021, 79, s. 379–400.

VALIM, M.P.; WECKSTEIN, J.D. A drop in the bucket of the megadiverse chewing louse genus *Myrsidea* (Phthiraptera, Amblycera, Menoponidae): ten new species from Amazonian Brazil. *Folia Parasitol* (Praha). 2013, 60(5), s. 377–400.

Kontaktní adresa: Marek Schneider, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23437@vfucz

Rozdíly v životních strategiích: luptouši versus péřovky

Understanding the life history characteristics of bird lice: *Amblycera* versus *Ischnocera*

Stanislav Kolenčík¹, Mario A. Loaiza-Muñoz^{2,3}, Gustavo A. Londono³, Julie M. Allen², Kristýna Plšková⁴, Oldřich Sychra⁴

¹Faculty of Mathematics, Natural Sciences and Information Technologies, University of Primorska, Koper, Slovenia

²Department of Biological Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA

³Departamento de Ciencias Biológicas, Bioprocesos y Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Diseño y Ciencias Aplicadas, Universidad Icesi, Cali, Colombia

⁴Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

Summary

Bird lice are permanent ectoparasites, adapted to living on their host and they face limited survival abilities and food availability off the host body. The objective of this study was to evaluate survival rates and food preference of two different group of lice — *Amblycera* and *Ischnocera*. The samples for study survivorship rates were collected during field research in the Anchicayá region, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia, in 2019. The results show that fast-moving lice from the suborder *Amblycera* have a shorter survival time outside their host compared to lice from the suborder *Ischnocera*. To assess feeding preferences, a total of 4,587 lice samples from the collection of Dr. František Balát were analyzed, comprising 1,418 amblyceran lice and 3,169 ischnoceran lice. Blood was detected in 36% of the *Amblycera* cases, comprising 43 species from 14 genera within the families Menoponidae and Ricinidae. The presence of blood in the digestive tract of lice from individual genera varied significantly, ranging from 4% to 100%. Genera such as *Hohorstiella* and *Machaerilaemus* showed exclusive blood presence in their diet. In ten other genera a combination of blood and feather-based diets was observed. The finding that lice are increasingly feeding on blood raises new questions about the potential transmission of blood parasites and the diversity of endosymbiotic bacteria.

Keywords: diet; ecology; ectoparasites; environment; survival

Úvod

Všenky jsou obligátní ektoparazité ptáků s různými životními strategiemi a mnohé jsou vysoce hostitelsky specifické (Price et al., 2003). Jsou vynikajícím modelovým organismem pro studium ekologické specializace a koevolučních mechanismů mezi hostiteli a jejich parazity. Hlavním zájmem výzkumníků v posledních letech se často týkají diverzity a hostitelské specifity všenek (Clayton et al., 2015; Price et al., 2003), ale údaje o přežití všenek a jejich toleranci vůči prostředí jsou bohužel relativně vzácné. Cílem této studie bylo porovnat schopnost přežívání všenek mimo hostitele a rozdíly v potravní preferenci mezi dvěma podřády – luptouši (*Amblycera*) a péřovky (*Ischnocera*). Přestože jsou morfologické a fylogenetické rozdíly těchto dvou podřádů dobře známé, odlišnosti v jejich ekologii a životních charakteristikách jsou stále málo prozkoumány.

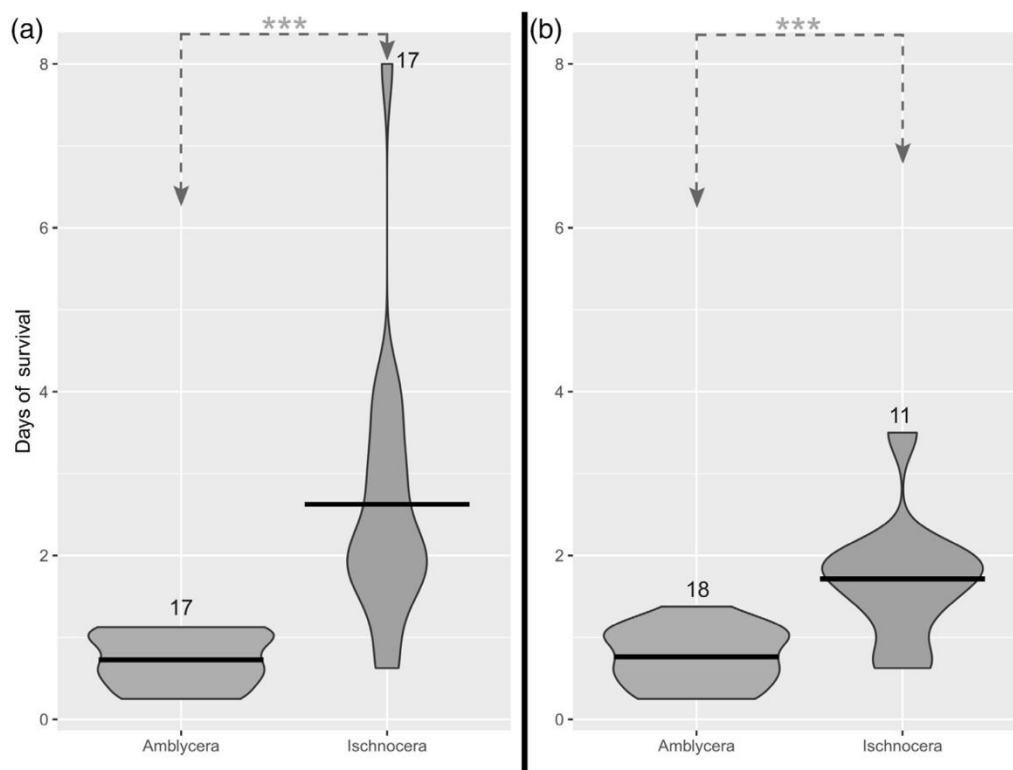
Materiál a metody

V této studii jsme napřed zkoumali schopnost přežití všenek po oddělení od hostitele v přítomnosti a nepřítomnosti peří. Vzorky byly získány během terénního výzkumu v oblasti Anchicayá v Kolumbii a doplněny o vzorky z České republiky. Ptáci byli odchyceni pomocí ornitologických sítí a všenky sbírány ručně nebo pomocí fumigačních komor s chloroformem. Následně byly všenky pozorovány v polních laboratořích a ptáci vypuštěni do přírody. Pro zhodnocení potravních preferencí všenek jsme použili dvě další datové sady. Využili jsme

sbírku trvalých preparátů Dr. Františka Baláta, která je uložena v Moravském zemském muzeu v Brně. Většina vzorků byla sesbírána z volně žijících ptáků chycených do ornitologických sítí na území bývalého Československa v letech 1946-1979. Sbírka je doplněna originálními rukopisnými seznamy a poznámkami o typech potravy v zažívacím traktu sebraných všenek, aby se předešlo případným omylům a dezinterpretacím způsobeným druhotným požitím krve např. u zastřelených ptáků. Také jsme použili dataset 212 všenek ze 14 špačků obecných (*Sturnus vulgaris*), kteří byli odchyceni pomocí ornitologických sítí v České republice v roce 2023. Dohromady jsme vizuálně pod mikroskopem vyhodnotili typ potravy (peří, krev, nebo obojí) u celkem 4375 všenek, z nichž bylo 1212 luptoušů a 3163 pérovek. Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu R.

Výsledky

Z analýzy schopnosti přežití jsme zjistili, že pérovky přežívaly mimo hostitele významně déle než luptouši ($p < 0,01$). Při následné suplementaci peří se prodloužila průměrná doba přežití u pérovek (z 1,7 na 2,6 dne) a maximální doba přežití se zvýšila více než dvojnásobně (z 3,5 dne na 8 dní), zatímco u luptoušů nebyl zaznamenán výrazný efekt. Celková aktivita luptoušů rapidně klesala s delší dobou strávenou mimo hostitele, pérovky byly pořád stejně aktivní, pokud měli přísun potravy (peří). Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v době přežití mezi různými druhy luptoušů ($p > 0,05$). Při analýze potravní preference jsme zaznamenali krev v trávicím traktu celkem u 36 % luptoušů a hned u několika rodů byla zjištěna přítomnost krve poprvé, zatímco u pérovek bylo nalezeno pouze peří. V případě deseti rodů – *Amyrsidea*, *Austromenopon*, *Ciconiphilus*, *Colpocephalum*, *Kurodaia*, *Menacanthus*, *Meromenopon*, *Myrsidea*, *Pseudomenopon* a *Ricinus* – byla pozorována jak krev, tak peří. Zjistili jsme také rozdíly v konzumaci krve mezi samci a samicemi (23 % vs. 39 %) a mezi dospělci a nymfami (33 % vs. 44 %).



Obrázek 1: Porovnání doby přežití všenek u dvou pozorovaných skupin – luptoušů (*Amblycera*) a pérovek (*Ischnocera*): (a) s přidavkem peří, (b) bez přidavku peří. *** hladina významnosti $p < 0,01$.

Diskuze

Zjištěné rozdíly v přežívání souvisí s dietními a fyziologickými strategiemi obou skupin. Větší mobilita luptoušů je pravděpodobně spojena s vyššími metabolickými nároky a nutností příjmu nutričně bohatší potravy (krve), což snižuje jejich šanci na přežití mimo hostitele. Péřovky, které se živí převážně peřím, jsou méně mobilní, mají pravděpodobně nižší metabolismus a jsou tak schopny přežít delší dobu. Potvrdili jsme konzumaci krve u několika rodů, u nichž již byla dříve zdokumentována, a to u rodu *Amyrsidea*, *Austromenopon*, *Ciconiphilus*, *Hohorstiella*, *Menacanthus*, *Myrsidea*, *Pseudomenopon* a *Ricinus*. Vysoký výskyt krve v zažívacím traktu u rodů *Ricinus* (100 %, n = 153) a *Menacanthus* (73 %, n = 273) potvrzuje, že krev je jejich běžnou součástí potravy. Na druhou stranu Nelson (1972) uvádí, že všeny rodu *Ricinus* se živí výhradně krví a nikdy se mu nepodařilo nalézt v trávicím traktu ani stopu po peří, v naší studii jsme zaznamenali ve dvou případech přítomnost peří i krve. Nově byla krev poprvé sledována u rodů *Ardeiphilus*, *Gruimenopon*, *Machaerilaemus*, *Kurodaia* a *Meropenopon*, ale díky nízkému počtu vyšetřených všenek nemůžeme z jistotou určit, jestli se tyto rody konzumují krev pravidelně anebo jen příležitostně. Při zjišťování přítomnosti krve v trávicím traktu je třeba vzít v úvahu, že všeny u ptáků sbíraných odstřelem, mohou po ulovení vyhledat otevřenou ránu a získat krev z ní. Ale u sběru pomocí fumigačních komor je krev pravděpodobně získávána propichováním brků nově rostoucích per kusadly (Trivedi et al., 1990) nebo sáním z ran na pokožce vzniklých nadměrným čištěním peří hostitelem (Khan et al., 2021).

Závěr

Naše studie ukazuje zásadní rozdíly mezi dvěma podřády všenek – luptoušů a péřovek ve schopnosti přežít mimo hostitele i v potravní specializaci. Péřovky, které se živí převážně peřím, přežívají mimo hostitele výrazně déle, což může souviset s jejich nižší mobilitou a nižšími metabolickými nároky. Naproti tomu luptouši jsou pohyblivější a v mnoha případech využívají krev jako důležitý zdroj živin, což potvrzují i naše výsledky – krev jsme zaznamenali u více než třetiny zkoumaných jedinců tohoto podřádu. Kromě potvrzení konzumace krve u známých rodů jsme zaznamenali krev i u několika dalších, u nichž nebyla dosud prokázána. Naše výsledky tak rozšiřují dosavadní poznání o ekologii těchto parazitů a poukazují na důležitost sledování jejich životních strategií nejen z hlediska přežívání, ale i z hlediska potenciální role v přenosu krevních parazitů a symbiotických mikroorganismů.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem 2025ITA23.

Literatura

- CLAYTON, D. H., BUSH, S. E. & JOHNSON, K. P. Coevolution of life on hosts: Integrating ecology and history. *Chicago, IL: University of Chicago Press*, 2015 p. 320.
- KHAN, G., ROY, S., KUMAR, S. & GUPTA, N. Analysis of the crop contents of two amblyceran lice infesting house crow, *Corvus splendens* (Insecta: Phthiraptera: Amblycera). *Acta Scientific Veterinary Sciences*. 2021, 3, 3–7.
- NELSON, B. C. A revision of the New World species of *Ricinus* (Mallophaga) occurring on Passeriformes (Aves). *University of California Publications in Entomology*. 1972, 68, 1–175.
- PRICE, R. D., HELLENTHAL, R. A., PALMA, R. L., JOHNSON, K. P. & CLAYTON, D. H. The chewing lice: world checklist and biological overview. *Champaign, IL: Illinois Natural History Survey Special Publication*. 2003, 24, p. 501.
- TRIVEDI, M. C., SHARMA, S., RAWAT, B. S. & SAXENA, A. K. Haematophagous nature of an amblyceran phthirapteran, *Menacanthus cornutus* Schommer, infesting poultry bird *Gallus domesticus* L. in India. *Journal of Applied Entomology*. 1990, 110, 107–111.

Kontaktní adresa: Kristýna Plšková, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42, Brno, H23435@vfu.cz

Baktérie odolné voči antibiotikám u volně žijících vtákov napříč Palearktidou

Antibiotic-Resistant Bacteria in Wild Raptors Across Palearctic Realm

^{1,2}Lucia Zelinová, ^{2,3}Lenka Davidová Geržová, ^{2,3}Iva Sukkar, ^{3,4}Hassan Tarabai, ^{1,2,3}Michaela Růžicková, ^{1,3}Tomáš Nohejl, ⁵Rainer Raab, ¹Marek Dostál, ⁶Hynek Matušik, ⁷Igor Karyakin, ⁸Mykola Skyrpan, ^{1,3}Ivan Literák, ^{1,2,3,9,10}Monika Dolejská

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VETUNI Brno, Brno, Česká republika

²Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Plzeň, Česká republika

³Středoevropský technologický institut, VETUNI Brno, Brno, Česká republika

⁴Středoevropský technologický institut, Masarykova Univerzita, Česká republika

⁵Technická kancelář pro biologii Mag. Dr. Rainer Raab, Deutsch-Wagram, Rakousko

⁶Březolupy, Česká republika

⁷Sibecocenter, LLC, Novosibirsk, Rusko

⁸Ukrajinské centrum výzkumu dravců a Západoukrajinská ornitologická společnost, Lvov, Ukrajina

⁹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Brno, Česká republika

¹⁰Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česká republika

Summary

Antibiotic resistance is a growing global concern, and wildlife is increasingly recognized as important environmental carriers of resistant bacteria. In this study, we investigated the occurrence and the diversity of antibiotic-resistant Enterobacterales in wild raptors across Palearctic region with special focus on plasmid-mediated resistance to critically important antibiotics. A total of 863 cloacal swabs were collected, with 25.7% yielding isolates with relevant resistance genes.

Whole-genome sequencing revealed high genetic diversity among isolates, including globally important sequence types and resistance mechanisms. Multidrug resistance was observed in 77% isolates. Plasmid profiling identified diverse replicon types, with ColV-positive IncF plasmids being the most common. Despite broad phylogenetic diversity, clonal groups were found across different regions and host species. Our findings highlight the role of wild birds of prey as both reservoirs and potential long-distance vectors of clinically relevant antimicrobial resistance.

Keywords: Antibiotics., wildlife, Enterobacterales, plasmids, One Health.

Úvod

Globálne šírenie baktérií rezistentných na antibiotiká (ARB), najmä gramnegatívnych druhov, predstavuje vážnu hrozbu pre verejné zdravie. WHO varuje, že bez rozhodných opatrení hrozí návrat do preantibiotickej éry liečby infekcií. Hoci hlavné príčiny antimikrobiálnej rezistencie (AMR) spočívajú v nadmernom používaní antibiotík v medicíne a poľnohospodárstve, čoraz viac výskumov upozorňuje na úlohu voľne žijúcich živočíchov v prenose ARB (Dolejska & Literák, 2019). Niektoré druhy dravých vtákov, ktoré sa živia zdochlinami a často navštevujú mestské skládky, môžu slúžiť ako rezervoáre a potenciálne aj ako vektory rezistentných baktérií (Tarabai et al., 2023). V našej štúdii sme analyzovali vyše 800 vzoriek z krajín Palearktu s cieľom zistiť výskyt ARB u dravcov a identifikovať mechanizmy rezistencie. Naše zistenia prispievajú k lepšiemu pochopeniu úlohy dravých vtákov ako potenciálnych rezervoárov baktérií rezistentných k rezervným antibiotikám a poukazujú na vplyv ľudskej činnosti na ich bakteriálnu kolonizáciu.

Materiál a metodika

V rokoch 2018-2022 bolo odobraných 863 kloakálnych výterov z voľne žijúcich dravých vtákov, najmä haje červenej a tmavej ($n=756$), naprieč Palearktídou. Vzorky boli zbierané v deviatich krajinách vrátane Česka, Nemecka, Ruska, Rakúska a Španielska z rôznych prostredí – mestských, poľnohospodárskych, prírodných alebo mix týchto lokalít. Po transporte do laboratória boli vzorky naočkované na MacConkey agary s antibiotikami: cefotaxím, ciprofloxacín, kolistín a meropeném. Izolované kolónie boli prečistené a identifikované pomocou MALDI-TOF MS. Do ďalších analýz boli zaradené len izoláty čeľade Enterobacterales. Pomocou PCR sa testovala prítomnosť génov rezistencie (ARG). Fenotypová produkcia na širokospektré beta-laktamázy (ESBL) a AmpC bola potvrdená pomocou MAST difúzneho testu. Izoláty s potvrdenými ARG boli vybrané na celogenómové sekvenovanie. DNA bola extrahovaná a spracovaná pre krátke čítania na platforme HiSeq (Illumina). Zo získaných dát boli programom Trimmomatic odfiltrované adaptorové sekvencie a nekvalitné čítania. Upravené dáta boli asemblované v programe SPAdes a podrobené ďalším analýzám. S využitím MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) bol určený sekvenčný typ (ST) bakteriálnych kmeňov. Plazmidové replikóny boli detegované nástrojom PlasmidFinder, gény pre rezistenciu k antibiotikám pomocou nástroja ResFinder a gény virulencie nástrojom VirulenceFinder. Fylogenetické stromy boli vytvorené pomocou RAXML a vizualizované v iTOL. SNP matice slúžili na hodnotenie genetickej príbuznosti medzi izolátmi, vrátane porovnaní s verejne dostupnými dátami z migračných oblastí.

Výsledky

Z celkového počtu 863 vyšetrených dravcov bol vo vzorke kloakálneho výteru detegovaný aspoň jeden izolát s cieľovým mechanizmom rezistencie u 201 (23 %) jedincov. Po selektívnej kultivácii sa najčastejšie zaznamenali rezistentné izoláty na pôdach s cefotaxímom (13 %) a ciprofloxacínom (12 %), zriedkavejšie na pôdach s prídavkom kolistínu (1 %), rezistencia voči meropenému nebola detegovaná. Najvyššia prevalencia ARB bola zistená u vzoriek z Ruska (39 %), nasledovaná Nemeckom (27 %) a Českom (14 %). Väčšina izolátov patrila do rodu *Escherichia* ($n = 172$), zvyšok tvorili iné rody čeľade Enterobacterales. Genomická analýza *E. coli* ukázala vysokú fylogenetickú diverzitu; celkovo bolo identifikovaných 100 rôznych sekvenčných typov (ST), najčastejšie ST10 (8 %) a ST162 (4 %). Fylogenetická analýza odhalila vysoký stupeň heterogenity bez jasného klastrovania, no boli identifikované viaceré klonálne skupiny s rovnakými profilmi rezistentných génov. Porovnanie s verejnými databázami nepreukázalo významné genetické príbuznosti s izolátmi z migračných trás vyšetrených dravcov. Až 66 % izolátov vykazovalo multirezistentné (MDR) profily, teda rezistenciu k minimálne trom a viac triedam antibiotík. Najčastejším identifikovaným génom bol *bla*_{TEM-1B} (34 %), kódujúci rezistenciu k beta-laktámom, nasledovaný *qnrS1* (31 %) pre rezistenciu na chinolóny. Gény kódujúce mobilnú rezistenciu na kolistín *mcr-1* (5 %) boli zistené u izolátov z Ruska, Nemecka a Česka. ESBL boli najčastejšie sprostredkované génmi *bla*_{CTX-M-14} (10 %) a *bla*_{CTX-M-1} (9 %), zatiaľ čo AmpC aktivita bola prevažne spojená s *bla*_{CMY-2} (9 %). Hoci nebola zistená fenotypová rezistencia voči meropenému, u jedného izolátu (ST349) bol po celogenómovom sekvenovaní detegovaný karbapenemázový gén *bla*_{OXA-244}. U plazmidmi sprostredkovanej rezistencie na chinolóny dominovali gény *qnrS1* (31 %) a *qnrB18* (16 %). Analýza plazmidov odhalila 54 rôznych typov replikónov, z ktorých najčastejšie boli prítomné IncFIB(AP001918) (39 %) a ColRNAI (36 %). U 35 % izolátov bola preukázaná prítomnosť plazmidov typu ColV, nesúcich gény rezistencie a gény pre produkciu bakteriálneho toxínu kolicínu. Typizácia F-plazmidov ukázala vysokú diverzitu, najrozšírenejším bol plazmid typu C4:A-B6 zistený u 13 izolátov z rôznych vtáčích hostiteľov a oblastí. U izolátov iných druhov než *E. coli* sa najčastejšie vyskytoval gén *bla*_{SHV-187} (12 %) a

*bla*_{ACT-15} (10 %). Gény *qnrA* a *qnrB* (n=) boli v prevahe prítomné u *Klebsiella* spp. Gén *mcr-9* pre kolistín sme zaznamenali u jedného izolátu *Enterobacter* spp..

Diskusia

Naša štúdia potvrdzuje, že voľne žijúce dravce predstavujú významný environmentálny rezervoár rezistentných baktérií, najmä multirezistentných izolátov *E. coli*. Takmer štvrtina testovaných jedincov niesla baktérie čeľadi Enterobacterales s klinicky významnými prenosnými mechanizmami rezistencie, pričom mnohé izoláty vykazovali komplexné a rôznorodé profily rezistencie vrátane génov kódujúcich rezistenciu k antibiotikám poslednej voľby. Najvyššia prevalencia ARB bola zaznamenaná v Rusku, čo môže súvisieť s vyššou expozíciou kontaminovanému prostrediu. Genetická diverzita izolátov *E. coli* a prítomnosť globálne rozšírených klonov (ST10, ST162), poukazujú na komplexnosť prenosových ciest. Napriek tomu, že sme nenašli priame genetické väzby s izolátmi z migračných trás, identifikácia klonálnych skupín s identickými SNP profilmi z rôznych krajín naznačuje existenciu spoločných environmentálnych zdrojov. Zvlášť zaujímavá je prítomnosť plazmidov typu ColV, často asociovaných s virulenciou a horizontálnym prenosom rezistencie (McKinnon et al., 2020). Viaceré izoláty s rovnakým replikónovým typom vykazovali podobné sérotypy a génové profily, čo poukazuje na stabilitu týchto plazmidov a ich význam pri šírení AMR faktorov v prírode. Detekcia karbapenemázového génu *bla*_{OXA-244} je varovným signálom tichej prítomnosti klinicky významnej rezistencie mimo nemocničného prostredia. Tieto výsledky zdôrazňujú potrebu zahrnutia voľne žijúcich zvierat do systémov monitoringu AMR, a to nielen ako indikátorov environmentálnej záťaže, ale aj ako potenciálnych vektorov pre šírenie rezistencie v globálnom meradle.

Záver

Voľne žijúce dravce sú významným rezervoárom multirezistentných Enterobacterales vrátane klonov a prenosných génov s klinickým významom. Naše zistenia poukazujú na rozmanitosť rezistencie a jej potenciál na geografické šírenie. Monitorovanie AMR v prostredí a u voľne žijúcich vtákov by malo byť súčasťou globálnych stratégií boja proti rezistencii.

Pod'akovanie

Štúdia bola finančne podporená projektom IGA VETUNI 222/2024/FVHE a ITA VETUNI 2024ITA31.

Literatúra

DOLEJSKA, Monika a LITERAK, Ivan. *Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria*. Online. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2019, roč. 63, č. 8, s. e01167-19. ISSN 0066-4804. <https://doi.org/10.1128/AAC.01167-19>.

McKINNON, J., ROY CHOWDHURY, P. a DJORDJEVIC, S.P. *Molecular Analysis of an IncF ColV-Like Plasmid Lineage That Carries a Complex Resistance Locus with a Trackable Genetic Signature*. Online. Microbial Drug Resistance. 2020, roč. 26, č. 7, s. 787–793. ISSN 1076-6294. <https://doi.org/10.1089/MDR.2019.0277>.

TARABAI, Hassan; KREJCI, Simon; KARYAKIN, Igor; BITAR, Ibrahim; LITERAK, Ivan et al. *Clinically relevant antibiotic resistance in Escherichia coli from black kites in southwestern Siberia: a genetic and phenotypic investigation*. Online. MSphere. 2023, roč. 8, č. 4, s. e00099-23. ISSN 2379-5042. <https://doi.org/10.1128/msphere.00099-23>.

Kontaktní adresa: Lucia Zelinová, MVDr., Ústav ekologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23439@vfu.cz

Editace:	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. Mgr. Ing. Bohdana Mrňousová, Ph.D. Mgr. Alena Zouharová, Ph.D.
Název:	XXVII. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie
Počet stran:	96
Vydání:	1.
Rok vydání:	2025
Vydavatel:	Veterinární univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-995-8